

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-204687

(43)Date of publication of application : 23.07.2002

(51)Int.Cl.

C12N 1/16
 A23L 1/30
 A61K 7/42
 A61K 7/50
 A61K 31/716
 A61K 35/72
 A61P 1/16
 A61P 3/10
 A61P 9/10
 A61P 9/12
 A61P 13/00
 A61P 19/02
 A61P 19/10
 A61P 25/00
 A61P 25/28
 A61P 29/00
 A61P 31/04
 A61P 31/12
 A61P 35/00
 A61P 37/02
 G01N 33/50
 //(C12N 1/16
 C12R 1:645)

(21)Application number : 2001-332459

(71)Applicant : ONAKA YASUSHI

(22)Date of filing : 30.10.2001

(72)Inventor : IKEWAKI NOBUNAO
 FUJII NOBORU
 ONAKA TAKASHI

(30)Priority

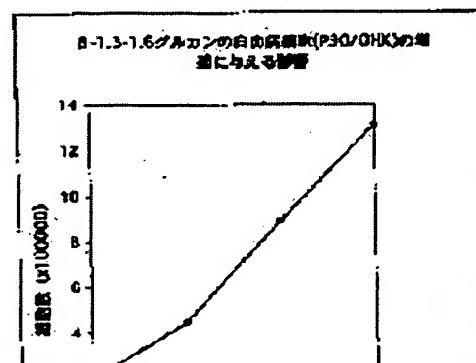
Priority number : 2000342310 Priority date : 09.11.2000 Priority country : JP

**(54) APPLICATION OF β -1,3-1,6-GLUCAN (AUREOBASIDIUM CULTURE SOLUTION) IN
 VARIOUS INDUSTRIAL FIELDS INCLUDING MEDICAL, HEALTH WELFARE AND FOOD
 INDUSTRIES**

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide applications of β -1,3-1,6-glucan produced by the use of the latest technique for culturing Aureobasidium fungi (Aureobasidium culture solution) in various industrial fields, particularly the medical, health, welfare, environment and food industries.

SOLUTION: Aureobasidium culture solutions or supernatants obtained by centrifuging the culture solutions are applied to the medical, health, welfare, environment and food industries, particularly as pharmaceutical preparations for various diseases (for



research and therapy), auxiliary reagents for clinical examination systems (clinical examination kits), new materials involved in preventing in-hospital infections and the cleanup of environmental pollutants, sterile foods for patients after subjected to transplantation, and functional supplements involved in the health maintenance of elderly persons and women (pregnant women, women suffered from menopausal disorders).

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 30.10.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-204687

(P2002-204687A)

(43) 公開日 平成14年7月23日 (2002.7.23)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/16		C 1 2 N 1/16	A 2 G 0 4 5
A 2 3 L 1/30		A 2 3 L 1/30	Z 4 B 0 1 8
A 6 1 K 7/42		A 6 1 K 7/42	4 B 0 6 5
7/50		7/50	4 C 0 8 3
31/716		31/716	4 C 0 8 6
審査請求 有 請求項の数27 O L (全 33 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2001-332459(P2001-332459)

(22) 出願日 平成13年10月30日(2001.10.30)

(31) 優先権主張番号 特願2000-342310(P2000-342310)

(32) 優先日 平成12年11月9日(2000.11.9)

(33) 優先権主張国 日本(J P)

(71) 出願人 500518326

尾仲 康史

岡山県備前市伊部741

(72) 発明者 池脇 信直

宮崎県延岡市古城町1-5-18

(72) 発明者 藤井 昇

宮崎県宮崎市原町1-37

(72) 発明者 尾仲 隆

岡山県備前市伊部752-1

(74) 代理人 100063484

弁理士 箕浦 清

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)の医療、保健、福祉、食品および各種産業分野での応用

(57) 【要約】

【課題】 β -1.3-1.6グルカンを主成分とするアウレオバシジウム培養液の利用

【解決手段】 アウレオバシジウム培養液またはその遠心分離による上清液を医療、保健、福祉、環境および食品分野、特に各種疾病に対する医薬品(研究および治療用)として、臨床検査システム(臨床検査キット)の補助試薬として、病院内感染防止、環境汚染物質の除去に関わる新規素材として、移植後患者の無菌食品、高齢者や女性(妊産婦、更年期障害)の健康維持にかかわる機能的な健康補助食品として応用する。

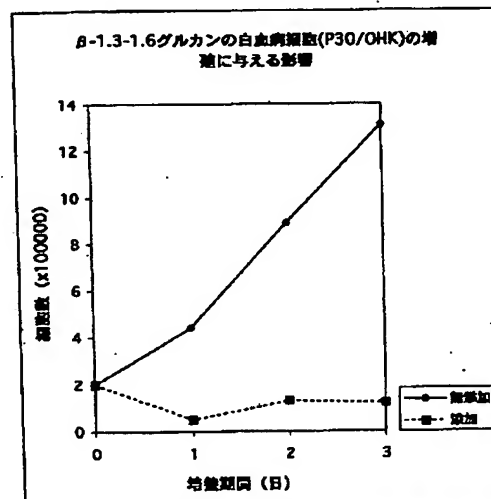


図5 β -1.3-1.6グルカンの白血球細胞(P30/OHK)の増殖に与える影響

【特許請求の範囲】

【請求項1】 β -1.3-1.6グルカンを含む主成分とするアウレオバシジウム (*Aureobasidium*) 培養液。

【請求項2】 アウレオバシジウム属に属する β -1.3-1.6グルカン産生菌を培養して産生されるアウレオバシジウム培養液である請求項1記載の培養液。

【請求項3】 アウレオバシジウム培養液を前処理として5,000回転10分間、さらには12,000回転10分間遠心分離した上清を加熱処理で殺菌したものである請求項1または2記載の培養液。

【請求項4】 請求項1から3までのいずれか1項記載のアウレオバシジウム培養液を有効成分とする各種疾病に対する予防または治療薬。

【請求項5】 請求項1から3までのいずれか1項記載のアウレオバシジウム培養液を有効成分とする各種疾病の発症および/または病態解明のための研究用試薬。

【請求項6】 各種疫病が、慢性関節リウマチ、膠原病、新興自己免疫疾患、ウイルス・細菌感染症、各種癌、癌の湿潤、転移、発癌ウイルス、神経疾患、痴呆症、アルツハイマー病、肝臓疾患、肝硬変、ウイルス性肝疾患、原因不明の難病、生活習慣病(糖尿病、高血圧、動脈硬化症、骨粗しょう症など)または日本人に大変多い痔(内外痔核、痔出血)などである請求項4または5記載の予防または治療薬あるいは研究用試薬。

【請求項7】 請求項1から3までのいずれか1項記載のアウレオバシジウム培養液を有効成分とする各種臨床検査キット(一般検査、生化学検査、病理検査、免疫血清検査など)の補助試薬(緩衝液、検査サンプルの保存安定剤、生理検査の抵抗防止剤など)。

【請求項8】 請求項1から3までのいずれか1項記載のアウレオバシジウム培養液を有効成分とする移植後の患者の無菌食。

【請求項9】 移植後の患者の無菌食が、骨髄移植後、免疫抑制剤を投与している患者の無菌室での無菌食である請求項8記載の無菌食。

【請求項10】 請求項1から3までのいずれか1項記載のアウレオバシジウム培養液を有効成分とする健康維持および/または増進のための健康補助食品。

【請求項11】 健康補助食品が食事摂取不能や嚥下障害を伴う高齢者、またはリハビリテーションを受ける患者の体力・抵抗力維持のための機能的健康補助食品である請求項10記載の健康補助食品。

【請求項12】 請求項1から3までのいずれか1項記載のアウレオバシジウム培養液を有効成分とする女性の健康維持食品。

【請求項13】 健康維持食品が妊産婦、更年期障害を持つ女性の生体バランスを調節するための機能的健康補助食品である請求項12記載の女性の健康維持食品。

【請求項14】 請求項1から3までのいずれか1項記載のアウレオバシジウム培養液を有効成分とする皮膚な

どの結合組織を守るコラーゲン類似物質または化粧品。

【請求項15】 請求項1から3までのいずれか1項記載のアウレオバシジウム培養液を有効成分とする病院内感染防止(環境微生物の繁殖防止)のための素材。

【請求項16】 素材が医療従事者の手、指などの消毒剤または病室の床等を含む病棟の清浄剤あるいは入浴不能の患者、寝たきり高齢者の身体の清拭剤である請求項15記載の素材。

【請求項17】 請求項1から3までのいずれか1項記載のアウレオバシジウム培養液を有効成分とする環境汚染物質除去のための素材。

【請求項18】 素材が内分泌攪乱物質(環境ホルモン、ダイオキシン類など)除去のための素材である請求項17記載の素材。

【請求項19】 請求項1から3までのいずれか1項記載のアウレオバシジウム培養液を有効成分とする病原微生物の汚染防止のための素材。

【請求項20】 素材が、手、指、体表面、性器などに付着する病原微生物の除去のための素材である請求項19記載の素材。

【請求項21】 素材が性病(淋病、梅毒など)の起因微生物(病原微生物)を、直接患部に塗布することによって除去するため請求項19または20記載の素材。

【請求項22】 請求項1から3までのいずれか1項記載のアウレオバシジウム培養液を有効成分とする各種DNAおよび/またはRNAウイルスを除去するための素材。

【請求項23】 素材がヘルペスウイルス、ポリオウイルス、インフルエンザウイルス、血液を介して感染する肝炎ウイルス(B、C型)、エイズウイルス、腫瘍ウイルスとしてのヒトパピローマウイルスや成人Tリンパ球白血病ウイルスなどの除去(感染防御)のための素材である請求項22記載の素材。

【請求項24】 請求項1から3までのいずれか1項記載のアウレオバシジウム培養液を有効成分とする紫外線防止のための素材。

【請求項25】 素材が皮膚に悪影響を与え、皮膚癌を起こす物理的因子(紫外線)をカットするための外用素材またはスポーツ選手、戸外で働く労働者の日焼け防止のための素材である請求項24記載の素材。

【請求項26】 請求項1から3までのいずれか1項記載のアウレオバシジウム培養液を有効成分とする筋肉疲労緩和に対する素材。

【請求項27】 素材が肉体疲労やスポーツ後の肉体疲労物質の経皮的緩和や筋肉疲労や痛みに関わる物質除去の素材である請求項26記載の素材。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は黒酵母菌(アウレオバシジウム)を最新の培養技術を用いて製造した β -1.3

-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）の各種産業分野、特に医療、保健、福祉、環境および食品分野での応用を目的とする。

【0002】産業上での応用に関しては健康食品、各種疾病に対する医薬品（研究用、治療用、臨床検査キット）、病院内感染防止または環境汚染物質除去に関わる新規素材（微生物繁殖防止剤）、皮膚の消毒、性病（梅毒や淋病）の予防、多くの難病の原因とされるウイルス感染症の予防、移植後の患者の無菌食、高齢者や女性の健康維持（妊産婦、更年期障害女性）のための機能的健康補助食品などが上げられる。また、皮膚に悪影響を与え、皮膚癌を起こす紫外線防止剤としての応用は、戸外で働く労働者、スポーツ選手、また夏の海水浴シーズンでの日焼けを防止するのに期待できる。さらに肉体的疲労やスポーツ後の肉体的疲労物質の経皮的緩和や除去剤としても非常に有用である。

【0003】一方、上述したように β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）の各種産業上の利用はもちろんのこと、これらの産業上の利用についての基礎データの蓄積は非常に重要である。 β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）の生体免疫系における調節作用、その作用機序の解明、 β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）の生体での評価システムの開発は医療、保健、福祉、環境、食品およびさまざまな産業分野での応用としての非常に重要なテーマである。また、 β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）の生体での効果を評価するためには、感染免疫や腫瘍（癌）免疫を中心とした動物実験のシステムを作り上げることも重要な課題である。

【0004】以上の観点から、我々が発明した β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）は本発明の実施例にも示すように、既存の β -グルカンには認められない非常にユニークな生理活性を示すことから医療、保健、福祉、環境、食品および各種産業分野での幅広い応用が期待できるものと考えられる。

【0005】

【従来の技術】多糖類はユニークな物性を有するもの、あるいは生理活性を有するものがあり、さまざまな方面から研究開発が行われている（浜田信威：高分子加工9-16, 1987、大野尚仁：日細菌誌 527, 2000、Kataoka-Shirasugi N, Ikuta J, Kuroshima A, Misaki A.: Biosci Biotechnol Biochem 58: 2145, 1994、Saito T, Tsuji T, Kitazawa H, Kawai Y, Itoh T. Biosci Biotechnol Biochem 62: 1445, 1998）。多糖類はブドウ糖や果糖など糖類の最小単位である単糖が多数結びついたもので、さまざまな種類がある。そのひとつであるグルカンはブドウ糖のみが結合したもので、その結合の仕方によって α -グルカンと β -グルカンの二種類に分けられる（Hamada N, Tsujisaka Y, Agric Biol Chem 30: 266, 1966）。その内、 β -グルカンはアガリクスやシイタケ

などのキノコ類、でんぷん、セルロース、酵母などの微生物培養液（微生物多糖類）、紅藻などの海藻類に多く含まれ、特に我々の発明した黒酵母（アウレオバシジウム）が産生するアウレオバシジウム培養液には β -グルカンが大量に含まれ、その量がキノコ類の約10倍以上に相当し、私たちの健康維持や増進に大きな役割を果たしている（藤井昇： β グルカンの威力 ベータグルカン研究会 著）。

【0006】微生物多糖類の特色は、ユニークな物性やさまざまな生理活性を有することである。すなわち、物性的には、食品に濃厚性や触感性を与え、増粘剤やゼリー食品の原料として、さらにカードランに代表される多糖体は酸化防止フィルムとして利用されている（Szezesniak AS, Farkas E: J Food Sci 27: 381, 1962、Smiey KM: Food Technol 20: 112, 1966）。また、微生物多糖類は安定性、保水性、分散性などにすぐれた特性を有しているので、化粧品、塗料、肥料、製紙、繊維などにも広範囲な用途が考えられている（Jeans A: Extracellular Microbiol Polysaccharides P. A. Sanford, A. Laskin, a. Laskin (eds) (Washington, D.C. American Chemical Society) 1977）。一方、医薬品への応用としては、デキストランが代用血漿あるいは血流改善剤として、シゾフィラン、スクレログルカン、カードランなどがその生理活性を応用して抗癌剤として一部利用されている（Komatsu N, Ohkubo S, Kikumoto S, Kimura K, Saito G, Sakai S, Gann 60: 137, 1969、Singh PD, Whisler RL, Tokuzen R, Nakahara W: Carbohydr Res 37: 245, 1974）。一般にその作用機序は化学的抗癌剤のように直接癌細胞に作用するのではなく、生体の免疫増強によるもので、カワラタケの含蛋白多糖 protein-bound polysaccharide K (PSK)、シイタケの多糖レンチナン、スエヒロタケの多糖シゾフィランはすでに癌の免疫療法剤として実用化されている（Sinha VR, Kumria R. Polysaccharides in colon-specific drug delivery. Int J Pharm 224: 19, 2001）。カワラタケ由来のPSKの研究に関しては数多くの論文が報告され、PSKによる生体免疫反応の増強やインターロイキン-2 (IL-2) や tumor necrosis factor- α (TNF- α)などのサイトカインの産生誘導、さらにNK細胞の活性化と癌（腫瘍）免疫への応用などが報告され、現在、世界中でPSKの基礎および臨床に関わる研究が行われている（Garcia-Lora A, Pedrinaci S, Garrido F. Cancer Immunol Immunother 50: 191, 2001）。我々も本発明とは異なったタイプの β -グルカンが実験動物の系において、メチルコラントレン-Iで誘導した腫瘍細胞や3LL固形腫瘍に対して抗腫瘍活性をもつことを確かめている（藤井昇、篠原智：宮大農報 33: 243, 1986）。このように β -グルカンには物性に加えて、生理活性として非常にユニークな特徴や作用のあるものがあり、今後、さまざまな産業分野、特に医療・保健・福祉、食品、環境の分野での応用が期待されてい

る。特に、環境分野での β -グルカンは環境微生物や病原微生物の処理、水の浄化処理など幅広く利用されようとしている。我々も「アミー」と言う商品名で β -グルカンを食品衛生や環境衛生、さらには公衆衛生の面で大変有用であることを確認している。

【0007】今回、我々が特に注目している点は、我々が独自で開発した β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）の健康食品、各種疾病に対する医薬品、病院内感染防止または環境汚染物質除去に関わる新規素材（微生物繁殖防止剤）、皮膚の消毒、梅毒、淋病などの性病の予防、多くの難病の原因とされるウイルス感染予防、移植後の患者の無菌食、高齢者や女性の健康維持（妊産婦、更年期障害女性）のための機能的健康補助食品、皮膚に悪影響を与え、皮膚癌を起こす物理的因子である紫外線防止剤としての応用、肉体疲労やスポーツ後の肉体疲労物質の経皮的緩和や除去剤としての応用など、医療、保健、福祉、食品、環境およびさまざまな産業分野での幅広い応用である。また、生体での生理活性作用（生体のバランスや生体免疫反応の調節作用）の解明、生体免疫反応を利用した β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）の評価システムなどの開発も上げられる。

【0008】 β -グルカンの生体での効果、特に生体バランスや生体免疫反応の調節作用については多くの研究が行われてきた。癌や感染症に対する防御効果などは β -グルカンは生体免疫反応をコントロールしていることを示唆するものである。また、免疫担当細胞である単球やマクロファージに β -グルカンレセプターが発現していること（Czop JK, Kay J : J Exp Med 173 : 1511, 1991, Xia Y, Ross GD : J Immunol 162 : 7285, 1999, Czop JK, Valiante NM, Janusz MJ : Prog Clin Biol Res 297 : 287, 1989）、さらに、 β -グルカンは免疫担当細胞からの炎症性のサイトカイン、例えばインターロイキン 1β (IL- 1β) のアンタゴニストであるインターロイキン 1β レセプターアンタゴニスト (IL- 1β Ra) の産生（Pou tsiaka DD, Mengozzi M, Vannier E, Sinha B, Dinarello CA : Blood 82 : 3695, 1993）、腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor- α : TNF- α)、インターロイキン 1β (IL- 1β)、血小板活性化因子 (platelet activating factor : PAF) の産生を誘導することなども報告されている（Abel G, Czop JK : Int J Immunopharmacol 14 : 1363, 1992, Elstad MR, Parker CJ, Cowley FS, Wilcox LA, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA : J Immunol 152 : 220, 1994）。

【0009】 β -グルカンレセプターの詳細な分子構造解析は、このレセプターが生体免疫反応をコントロールしている補体のC3成分に対するレセプター（CR3）で最近、接着分子（インテグリン系のCD11b/CD18分子）そのものであることも明らかにしている（Ross GD, Cain J A, Myones BL, Newman SL, Lachmann PJ : Complement 4

: 61, 1987, Thornton BP, Vetvicka V, Pitman M, Goldman RC, Ross GD : J Immunol 156 : 235, 1996）。このCR3（CD11b/CD18）分子は主に単球やマクロファージの細胞表面やNK細胞に発現しているレセプターであり、CD11b/CD18分子に結合した β -グルカがこのレセプター（CR3）分子を経由して活性化されたNK細胞がガン細胞の破壊や排除に関係していることもがわかってきた（Di Renzo L, Yefenof E, Klein E : Eur J Immunol 21 : 1755, 1991, Ross GD, Vetvicka V, Yan J, Xia Y, Vetvickova J : Immunopharmacology 42 : 61, 1999, Yan J, Vetvicka V, Xia Y, Coxon A, Carroll MC, Mayadas TN, Ross GD : J Immunol 163 : 3045, 1999）。

【0010】 β -グルカンレセプターからのシグナル伝達様式の解析も進み、このシグナル伝達系に免疫B細胞の核内伝達物質であるNF- κ Bが密接に関与していることも確認されている（Wakshull E, Brunk-Reese D, Lindermuth J, Fiset L, Nathans RS, Crowley JJ, Tufts JC, Zimmerman J, Mackin W, Adams DS : Immunopharmacology 41 : 89, 1999）。また、ガンの治療モデル実験では、 β -グルカが補体C3成分のレセプター（CD11b/CD18分子）であることから（Yan J, Vetvicka V, Xia Y, Coxon A, Carroll MC, Mayadas TN, Ross GD : J Immunol 163 : 3045, 1999）、このレセプターを介した経路がガンの特異抗体でオプソニン化されたガン細胞の破壊に効果的であると報告している（Xia Y, Vetvicka V, Yan J, Hanikyrova M, Mayadas T, Ross GD : J Immunol 162 : 2281, 1999）。一方、免疫反応に影響を与える薬剤と β -グルカンレセプターとの機能的実験も行われており、特に、 β -グルカンレセプター（CD11b/CD18分子）がグルココルチコイドでそのレセプター機能が亢進することなど、新たな β -グルカンの生体免疫系での役割が判明してきている（Yashioaka S, Ohno N, Miura T, Adachi Y, Yadamac T : FEMS Immunol Med Microbiol 21 : 171, 1998, Kay J, Czop JK : Immunology 81 : 96, 1994）。

【0011】 β -グルカンのin vivo（動物実験）での効果も検討されている。すなわち、この研究は β -グルカン投与マウスが致死量の放射線を受けても延命効果を発揮すると言うもので、この作用機序としては β -グルカが血液造血細胞（造血幹細胞）を効果的に刺激し、免疫担当細胞を成熟過程へと方向づけている結果であると考えられている（Patchen ML, Mac Vitte TJ, Brook I : Methods Find Exp Clin Pharmacol 8 : 151, 1986）。この事実は、 β -グルカが造血幹細胞の分化成熟にもある種の効果を与えている結果として大変注目されている。さらに、 β -グルカが結核感染症やストレプトコッカスミュータンスの感染防御にも効果を示すことが確認されている（Hetland G, Lovik M, Wiker HG : Scand J Immunol 47 : 548, 1998, Jespersgaard C, Højshengallis G, Huang Y, Russell MW, Smith DJ, Mic

halek SM : Infect Immun 67 : 6543, 1999)。これらの結果は主に β -グルカンが生体の免疫増強効果を発揮していることを示唆するものである。一方、これらの生体免疫増強効果は細胞レベルでは、多くの細胞内伝達物質が関わっており、最近、このシグナル伝達系に免疫系の活性化や制御をコントロールしているmitogen activating protein kinase (MAPK)やカルシウムが密接に関わっていることも判明してきている (McLeish KR, Klein JB, Coxon PY, Head KZ, Ward RA : J Leukoc Biol 64 : 835, 1998, Mork AC, Helmke RJ, Martinez JR, Michalek MT, Patchen ML, Zhang GH : Immunopharmacology 40 : 77, 1998)。

【0012】臨床的に非常に興味あるデータも報告されている。すなわち、血漿中の β -グルカン類似物質が肺炎などで上昇することで、この事実は血漿中の β -グルカン類似物質の動態が肺炎の治療指標として有益であることを示唆するものである。また、この血漿中の β -グルカン類似物質がエイズ様症状をとまなわないカリニ肺炎でも上昇することから、 β -グルカン類似物質の臨床的な、特に治療・診断のモニタリングとしての有効性が再確認されてきている (Teramoto S, Sawaki D, Okada S, Ouchi Y : J Med Microbiol 49 : 393, 2000)。

【0013】生体免疫系の調節以外にも β -グルカンはさまざまな分野、特に環境の分野で利用されようとしている。その一つとして、皮膚に悪影響を与え、皮膚癌を起こす物理的因子(紫外線)を防止するための新規外用素材としての応用はアメリカではその効果が確認されており、さらに電離放射線など発癌性をもつ放射線に対してもその効果が一部確認されてきている。紫外線や電離放射線は主に、細胞の死を誘導し、細胞本来の機能を抑制すると考えられている。これはアポトーシス(アポトーシス)と呼ばれ、細胞、器官、臓器の発生、分化、発達においても大変重要な役割をもつ生物現象である (Yonehara S, Ishii A, Yonehara M. J Exp Med 169 : 1747, 1989)。また、免疫系においてもアポトーシスはリンパ球の分化や成熟、さらに癌破壊に密接に関わるメカニズムとして大変重要な免疫反応である。アポトーシスはさまざまな条件下で生じる生物現象で、核内DNAの断裂(ラダー現象)がその特徴である (Gunji H, Kharbana S, Kufe D. Cancer Res 51 : 741, 1991)。このDNAのラダー現象にはエンドヌクレアーゼと言われる酵素が関与し、現在さまざまな酵素が発見されている。一方、アポトーシスを抑制し、細胞の死滅を防ぐ方法やそれに関わる分子(遺伝子やタンパク質)もいくつか同定されている。また、アポトーシス誘導のメカニズムも明らかにされ、特に、細胞内セカンドメッセンジャー、 Ca^{2+} の細胞内流入、protein kinase C (PKC)、protein kinase A (PKA)、protein tyrosine kinase (PTK)などのリン酸化酵素群、cAMP、cGMPまたは分裂増殖に密接に関わる分子などが密接に関わっていると考えられている (Takaya

ma E, Seki S, Ohkawa T, Ami K, Habu Y, Yamaguchi T, Tadakuma T, Hiraide H. J Immunol 164 : 5652, 2000)。我々が開発した β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)も、細胞の分裂や増殖を誘導する反面、白血病細胞には細胞死(アポトーシス)を誘導するなど、生理活性としてさまざまな機能を有していることを確認している。

【0014】一方、本実施例からも紫外線照射による細胞死を β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)が約50%その影響を抑制することは、今までに報告されておらず、特に、戸外で働く労働者、スポーツ選手、また夏の海水浴シーズンでの日焼け防止や皮膚癌の予防における新規素材としての応用できると思われる。最近、A型ボツリヌス毒素が腰痛を緩和することがJabbari博士より報告された (Foster L, Clapp L, Erickson M, Jabbari B. Neurology 56 : 1290, 2001)。それはA型ボツリヌス毒素を注射された患者さん73%が痛みの程度が50%以上軽減されたと言うものである。そのメカニズムはA型ボツリヌス毒素が筋痙攣の量や程度を緩和する、薬剤が感覚繊維からのインプットを減らす、痛みの受容器に働きかけるなどが考えられている。そこで我々が開発した β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)も紫外線による細胞への悪影響を50%緩和することから、 β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)の皮膚への擦り込みが筋肉疲労物質の除去や緩和に応用できる可能性があると考え、大変興味深い。

【0015】アウレオバシジウム培養液の主成分は β -1.3-1.6グルカンであるが、我々はアウレオバシジウム培養液から β -1.3-1.6グルカンを分離精製し、その効果をさまざまな分野で解析しているわけではなく、アウレオバシジウム培養液そのものを解析に用いている。そう言う意味からアウレオバシジウム培養液には β -1.3-1.6グルカン以外にも未知の生理活性物質が存在する可能性があると考えられる。そこで我々はアウレオバシジウム培養液中の免疫系の活性化や調節に関わる新規の物質の同定を試みた。その結果、アウレオバシジウム培養液中に、免疫活性作用をもつCD24、mNI-37分子が存在していることが明らかになった。CD24分子は以前はheat stable antigen (HSA)と呼ばれていた物質で、免疫担当細胞のB細胞に主に発現している分子である (Mittler R S, Talle MA, Carpenter K, et al. J Immunol 131 : 1754, 1983)。機能としてはB細胞の分化成熟、抗体産生の調節などに深く関与している。CD24分子の構造は糖鎖構造を多く持つのが特徴である。最近、このCD24分子が細胞と細胞の接着分子としての機能を有していることがわかり、CD24分子の免疫反応における重要な役割を果たしていることが判明してきた (Kadmon G, Eckert M, Sammar M, et al. J Cell Biol 118 : 1245, 1992)。また臨床的にも悪性度の高い乳癌にはCD24分子が高頻度に発現していることが判明し、このCD24分子を指標に乳

癌の悪性度を診断、またはCD24分子を標的にした免疫療法（抗体によるミサイル療法など）が行われている。我々もこのCD24分子がリンパ球系細胞でないHela細胞（本実施例でも使用）に発現していることを見出し、このCD24分子が細胞内セカンドメッセンジャー、特にリン酸化酵素protein kinase C (PKC)によって制御されていることも突き止めている（Tadakuma T, Ikewaki N, Yasuda T, Tsutsumi M, Saito S, Saito K. *Antimicrob Agents Chemother* 28 : 28, 1985）。一方、mNI-37分子は我々自身で見出した非常にユニークな物質である（Shibuya, A, Ikewaki, N. *Hepatology Research in press*）。この分子は42kDaの分子量で、細胞膜表面には存在せず、細胞質内や核内に存在している。またこの分子は前述した細胞のアポトーシス（アポトーシス）を起こした細胞にのみ発現することから、細胞の増殖や分化周期に関わっているものと考えられる。また、この分子はC型肝炎ウイルスに感染し、肝硬変や肝臓癌を伴った患者の末梢血リンパ球にも有意に発現することから、これらの疾病の発症メカニズムにも深く関与しているものと考えられる。以上のようなアウレオバシジウム培養液中には主成分として含まれる β -1.3-1.6グルカン以外にも生体免疫反応をコントロールする分子群（CD24およびmNI-37分子）が存在することは β -1.3-1.6グルカンと相乗効果を促して、アウレオバシジウム培養液の最大限の効果が発揮されているものと予想される。これは新しい機能的健康食品の形態を作り上げる第一歩であると思われる。

【0016】一方、 β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）は粘性に富み、さまざまな物質を吸着する能力を有する。本実施例でも β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）がポリオウイルスを吸着し、 β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）がウイルスの細胞の感染を抑制する効果を得ている。このことは β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）が薬剤を包み込み、効果的に薬剤の効果を発揮するドラッグデリバリーシステム（DDS）として応用が可能であることを示唆している。特に、結核、リステリア、チフスなどの細胞内細菌感染症、また各種ウイルス、特に血液を介して感染する肝炎ウイルス（B,C型）、エイズウイルス、また成人Tリンパ球白血病ウイルスやヒトパピローマウイルスなどの癌ウイルスに対するDDSとしての利用が可能であると思われる。以前から、DDSの対象としてはリン脂質やコレステロールで作製されたリボソームが利用されてきた。例えば、抗癌剤や抗菌剤などをこのリボソームにトラップさせ、副作用が少なく、薬効が長期に持続性するDDSが応用されてきた。我々も、ストレプトマイシン（SM）をリボソームに封入し、このSM封入リボソームがDDSとして実験マウスチフス症の治療に非常に有効であることを報告している（Ikewaki N, Yamamoto R, Mori N et al. *J Kyushu Univ Health and We*

lfare 1 : 123, 2000）。しかしながら、リボソームの作製、薬剤の封入条件が一定しないことなどから、それに代わるDDSが望まれていた。そこで β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）が新しいタイプのDDSとして応用できる可能性が出てきたわけである。

【0017】多くの多糖類や β -グルカンが自然界から見い出されさまざまな領域で利用されてきている。しかしながら、問題点としてこれらの多糖類の効果を評価できる一定した評価システムが無いことである。そこで、これらの多糖類や β -グルカンの生体での効果を評価できるシステムの開発が望まれるようになってきた。この評価システムを開発するためにさまざまな方法が利用されてきたが、まだ一定の評価システムは開発されていない。そこで我々は免疫系のメディエーターであるサイトカイン、特に数多くのサイトカインの中からインターロイキン-8（IL-8）の産生動態に着目し、このIL-8を指標に多糖類や β -グルカンの効果を評価できる新規の評価システムを開発した。IL-8は主に好中球や単球、マクロファージから産生される走化性を有するタンパク質である（de Boer JH, Hack CE, Verhoeven AJ, Baarsma GS, de Jong PT, Rademakers AJ, de Vries-Knoppert W A, Rothova A, Kijlstra A. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34 : 3376, 1993）。しかし、最近ではほとんどすべての細胞からIL-8が産生されることが確認され、またその誘導剤もさまざまなものが見つかっている。例えば、細菌の内毒素であるリポポリサッカライド（LPS）、グラム陽性および陰性細菌、寄生虫、ウイルス、各種サイトカイン、各種サイトカイン、protein kinase C (PKC) 活性化剤であるフォルボールエステル（PMA）、また環境分野では水銀、ハウスダスト、ディーゼル排気ガスなどが上げられ、その作用メカニズムは短期間でIL-8 mRNAの発現とタンパク質分泌が誘導されると言うものである（Vlahopoulos S, Boldogh I, Casola A, Brasier AR. *Blood* 94 : 1878, 1999）。特に環境ホルモンによるIL-8産生の動態変化は環境問題を考察していくには非常に重要な情報を提供してくれるものと思われる。また、IL-8は抗菌/抗癌サイトカインとも言われ、このサイトカインには多くの微生物や癌細胞を死滅させる能力がある（Wigmore SJ, Fearon KC, Maingay JP, Lai PB, Ross JA. *Am J Physiol* 273 : E720, 1997, Akiba J, Yano H, Ogasawara S, Higaki K, Kojiro M. *Int J Oncol* 18 : 257, 2001）。以上のように、IL-8は生体の微妙な免疫系の変化に対して産生されるサイトカインであるため、IL-8産生の動態変化を捕らえたことは微妙な生体変化を客観的に把握できる利点があり、IL-8産生の動態変化を捕らえた我々の β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）の評価システムは生体免疫反応を解明するための格好のシステムであると考えられる。さらに、この評価システムは β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）の生体での効果を評価するのみならず、さ

ざまな構造をもった β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）アナログの生体での効果も評価できるシステムであると考えられる。

【0018】以上のような背景から、 β -1.3-1.6グルカンに関しては実にさまざまな分野でその効果が報告され始めてきている。我々が発明した β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）にも今までのグルカンにはない非常にユニークな物性や生理活性があることが判明してきている。本発明の実施例では既存の β -グルカンには認められない非常にユニークな物性と生理活性をさまざまな手法を用いて証明していくと共に医療、保健、福祉、環境、食品およびさまざまな産業分野での幅広い応用が可能であると考えられる。

【0019】

【発明が解決しようとする課題】 β -グルカンは物性と生理学的特性から生体のバランスを調節する非常に興味深い物質であることが判明してきた。さらに本発明の実施例でも示すように、我々の発明した β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）は既存の β -グルカンと比較して非常にユニークな特性を示すこともわかってきた。しかしながら、 β -グルカンの詳細な作用機構や産業上での応用、特に医療、保健、福祉、環境、食品および各種産業分野に関してはまだ未解明な点も多いのが現状である。そこで、我々は独自で開発した β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）の医療、保健、福祉、環境、食品およびさまざまな産業分野での応用を試みるための基礎的な研究を試みている。

【0020】産業上での応用に関しては健康食品、各種疾病に対する医薬品（研究用、治療用、臨床検査キット）、病院内感染防止または環境汚染物質除去に関わる新規素材（微生物繁殖防止剤）、皮膚の消毒、性病（梅毒や淋病）の予防、多くの難病の原因とされるウイルス感染症の予防、移植後の患者の無菌食、高齢者や女性の健康維持（妊産婦、更年期障害女性）のための機能的健康補助食品などが上げられる。また、皮膚に悪影響を与え、皮膚癌を起こす紫外線防止剤としての応用は、戸外で働く労働者、スポーツ選手、また夏の海水浴シーズンでの日焼けを防止するのに期待できる。さらに肉体疲労やスポーツ後の肉体疲労物質の経皮的緩和や除去剤としても非常に有用である。

【0021】一方、 β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）の生体免疫系の調節効果はもちろんのこと、 β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）の生体での作用機序の解明や β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）の評価できるシステムの開発は医療、保健、福祉、環境、食品およびさまざまな産業分野での応用としての非常に重要な基礎研究である。また、生体での効果を評価するためには、感染免疫や腫瘍（癌）免疫を中心とした動物実験のシステムを作り上げることが重要な課題である。

【0022】これら全ての課題は早期に解決できる内容であり、本実施例にも示すように β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）が今までに報告されていない非常にユニークな物性や生理活性をもつことが明らかにされてきている。

【0023】

【課題を解決するための手段】発明者らは最新の培養技術で培養された黒酵母菌（アウレオバシジウム）の産生する β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）の各種産業分野での応用として、生体免疫反応に与える影響や効果を最新の免疫学的手法を取り入れ解析を行っている。

【0024】その結果、この β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）が生体免疫反応の主役を演じているリンパ球の数を増やすこと、DNA合成能（細胞分裂）を誘導すること、単球系モデル細胞の形態変化や細胞膜表面上の機能的な分子（レセプター）を修飾すること、抗体産生能、各種サイトカインの産生能、細胞膜表面分子の動態変化、細胞内セカンドメッセンジャーの動態に影響を与えることなど、 β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）が生体免疫反応を高める性質があることを見出している。さらに β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）に手、足および性器に付着した病原および非病原微生物の増殖を抑制する作用があることも見出している。今までに一部の β -グルカンで生体免疫反応を高める作用があることは報告されていたが、我々の発明した β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）は、今までに報告された β -グルカンとは異なった非常にユニークな物性や生理活性作用を示すことが判明してきている。我々が最新培養技術で開発した β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）はさまざまな産業分野（医療、保健、福祉、環境さらには食品工業）で応用可能な新規の β -グルカンである。

【0025】この発明で用いられる β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）は我々独自で開発改良を加えた最新培養技術で産生された β -グルカンである。この β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）にはキノコの約10倍量の β -グルカンが含まれている。

【0026】 β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）の生体免疫系への影響・効果を解析するために健康人の末梢血から末梢リンパ球を常法により分離する。次ぎに分離されたリンパ球を β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）添加群と無添加群に分け、培養液にて一定期間培養し、 β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）のリンパ球数、リンパ球の細胞分裂、IgG抗体産生量、サイトカイン産生に与える影響を検討する。また、位相差顕微鏡を用いてその形態変化を観察する。さらに β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）培養後のリンパ球細胞表面分子

(レセプター)の検討、癌細胞(白血病細胞)の増殖に与える影響、 β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)の生体に付着した微生物の除去効果などを検討する。本実施例に示す培養液としてはRPMI 1640に10% fetal calf serum (FCS)や20% human serum (HS)を加えたものを用いる。リンパ球細胞表面分子(レセプター)の解析には特異的レセプター(分子)を識別するモノクローナル抗体(CD分子に対するモノクローナル抗体)を用いて解析する。この抗体の一部は我々独自で開発したものも含まれる。

【0027】リンパ球の数の算定には血球計算板を用いて位相差顕微鏡下で観察、算定する。リンパ球の細胞分裂(DNA合成能の測定)には一般的な方法を用いる。すなわち、細胞周期に関わるDNA合成能をアイソトープであるトリチウムサイミジン(^3H -thymidine)を用い、その取り込み量を液体シンチレーションカウンターで測定するものである(一分間あたりのカウント数cpmで表す)。

【0028】 β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)によるヒト末梢血リンパ球からの抗体産生量、すなわち、免疫細胞であるB細胞からのIgG抗体産生量の測定は酵素抗体法を用いて測定する。すなわち、常法に従い、2抗体酵素抗体、enzyme immunoassay (EIA)法を用いて、実際の培養液中の抗体量を測定する。抗体量を測定する方法は種々あるが、例えばブラーク法を用いた方法、オクテロニー法、蛍光抗体法などがある。本実施例で用いたEIA法は感度が非常に高く、少量の材料でも測定可能であることから免疫学的検査法として常用されている方法である。

【0029】 β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)によるリンパ球への影響を検討するために、免疫系の中枢に密接に関わっているサイトカイン(インターロイキン、インターフェロン)の産生量を酵素抗体法で測定する。酵素抗体法は血清や培養液中のサイトカイン量を測定する方法で、現在種々の会社からキットが販売されている。今回はヒトの免疫系に密接に関わるサイトカイン(インターロイキン1、2、4、6、8、インターフェロン γ)を本方法を用いて測定する。このサイトカインの量やその動態は生体の免疫システムを評価するために非常に有益な方法である。

【0030】 β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)によるリンパ球の形態変化を検討するために、 β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)で培養されたリンパ球を位相差顕微鏡下で観察する。次にその形態変化、特に細胞の形、細胞表面のラッフル構造の変化を観察し、写真撮影する。今後は走査型の電子顕微鏡(SEM)を用いてより詳細に細胞の形態を観察する。

【0031】 β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)で培養したリンパ球またはモデル細胞表面分子(レセプター)の動態変化に検討に関してはフローサイトメトリー法(fluorescence activated cell sorter :

FACS)を使用する。この方法は免疫学的解析手段として、細胞表面抗原、レセプターの動態を解析し得る最新鋭の方法である。この測定は細胞表面に特異的に反応するモノクローナル抗体と蛍光で標識した抗体を用いて行う方法で、実際には蛍光強度をレーザー光反射量を取り込んでコンピューターで画像解析し、結果をヒストグラム化する方法である。

【0032】 β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)の癌細胞、特に白血病細胞の増殖に与える影響は、ある一定期間、 β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)で培養されたガン細胞の生死をもって判定する。すなわち、本法は β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)で培養された白血病細胞を回収し、血球計算板を用いて癌細胞の生死をカウントし、癌細胞の増殖度を検討するものである。一部の実験では染色液を用いて細胞を実際に染色し、 β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)の癌細胞の増殖度に与える影響を検討する。

【0033】 β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)の環境微生物の除去効果の検討には、バームスタンプ(普通寒天培地)(手のひら用)を用いる。この方法は、バームスタンプ上で増殖した微生物のコロニーをカウントする方法で、皮膚表面に付着した環境微生物の数を簡単に検討できる方法である。今回は寒天培地としてトリプトソイ普通寒天培地(培地:トリプトン、ソイペプトン、塩化ナトリウム、寒天)を用いたが、例えば病院内感染の主な微生物であるブドウ球菌を調べる場合にはマンニット食塩寒天培地、食中毒などに関係するサルモネラ菌や大腸菌群などにはSS(Salmonella-Shigella)寒天培地やドリガルスキーの寒天培地などの選択寒天培地などを用いる。それぞれの寒天培地にはフェノールレッドやBTB(ブロムチモールブルー)などのpH指示薬が入っており、培地の色を判定することで微生物の増殖を知ることができる。

【0034】 β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)の病原微生物の除去効果の検討には、普通寒天培地平板法を用いる。この方法は、【0033】のバームスタンプ法と同様、寒天平板上で増殖した微生物のコロニーをカウントする方法である。これは微生物の数を簡単に検討できる方法である。寒天培地としてトリプトソイ普通寒天培地(培地:トリプトン、ソイペプトン、塩化ナトリウム、寒天)を用いたが、今回は病原微生物(ブドウ球菌、大腸菌、サルモネラ菌、緑膿菌)を対象にしたため、マンニット食塩寒天培地、SS(Salmonella-Shigella)寒天培地やドリガルスキーの寒天培地などの選択寒天培地などを用いる。さらにハートインフュージョン培地を用いる。これと並行して増菌用に普通ブイヨンも用いた。それぞれの寒天培地にはフェノールレッドやBTB(ブロムチモールブルー)などのpH指示薬が入っており、培地の色を判定することで微生物の増殖を知ること

ができる。

【0035】ウイルス感染防御効果をポリオウイルスを用いる。Hela細胞（子宮頸部癌の株化細胞）はポリオウイルスの標的細胞として利用され、ポリオウイルス感染実験に関しては多くの論文がある。培養後のHela細胞のポリオウイルスによる細胞変性効果(CPE)は位相差顕微鏡下で観察し、または色素染色をして、その染色の強弱をコンピューターに取り込み画像処理し、細胞変性効果(CPE)を定量化する。Hela細胞へのポリオウイルスの吸着や感染はポリオウイルスレセプター(CD31分子)に対するモノクローナル抗体を利用し、感染メカニズムの詳細を解析する。

【0036】紫外線による細胞死の抑制効果を検討するために【0035】と同様にHela細胞を用いた。これは【0035】での実験結果を基礎にしたためにこの細胞を用いた。また接着細胞であるため、形態や容易に観察し易い利点がある。紫外線ソースはクリーンベンチ付属紫外灯を使用した。紫外線照射による細胞変性の確認は位相差顕微鏡下で観察すると同時に、トリパンブルー染色液で染色し、死細胞と生存細胞を明瞭に区別する。これも細胞変性を検討するためには簡単で有効な方法である。さらに、この紫外線照射による細胞変性にはプログラム死（アポトーシス）が関与していると考えられるので、アポトーシス検出キットやDNAの破壊（ラダーパターン）を電気泳動法（ミニゲル）で分離し、エチルブロミドで染色し、DNAの破壊（ラダーパターン）を観察し、写真撮影する。この方法も、アポトーシス検出には確立された方法で、鋭敏かつ簡単な方法で、アポトーシス検出が可能である。

【0037】 β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）の生体での効果をするための新規評価システムの開発と確立を行うために生体免疫反応に密接に関与するサイトカインでありインターロイキン-8 (IL-8)の動態を指標に検討した。IL-8はさまざまな物質で産生され、早期にmRNAやタンパク質レベルでその変動を確認することができる。培養細胞株(U937細胞)は免疫システムを解明するためのモデル細胞として世界中で使用され、多くの論文があり、また、ヒト末梢血リンパ球は生体での1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）の作用を解析するためには非常に有益な細胞である。培養液中に含まれるIL-8の産生量を酵素抗体法(TFB社: IL-8検出キット)を用いて測定する。この測定系は非常に安定した系で感度も高く再現性が高い方法である。

【0038】 β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）の培養細胞株に対するDNA合成能をトリチウムサイミジン(3H-tymidine)を用いてのDNA合成能の測定を行った。この方法も細胞のDNA合成能を測定するには一般的な方法でかつ、感度が高く、方法論としては簡単な操作である。

【0039】 β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）の作用メカニズムを解明するための手段として、特に細胞内シグナル伝達系に密接に関わるリン酸化酵素であるprotein kinase C (PKC)、protein tyrosine kinase (PTK)、 Ca^{2+} の細胞内流入を特異的に抑制する薬剤（インヒビター）を用いる。免疫学や薬理学の分野では比較的頻繁に使用される薬剤で、その作用機序やメカニズムも十分解明されている薬剤を β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）の作用メカニズムを解明するための手段として用いる。またこれらの薬剤の効果を判定するために【0037】で用いた我々が独自に開発した方法論を用いた。この方法論は特異性が高く、再現性にも優れている。

【0040】実験動物を用いて β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）の生体免疫反応に与える影響を検討した。 β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）の生体免疫反応に与える影響を検討するために実験動物 (BALB/C および C57BL/6Nマウス)を用いた。これらのマウスは生体免疫反応解析するために頻繁に使用されるマウスで、これらのマウスを用いた研究論文は数多くあるため、さまざまな側面から実験結果を検討することができる。生体免疫反応を解析するための実験系としては、マウスはキラーT細胞の活性化能、NK細胞活性化能を用いる。これらの細胞群の検査には標的細胞を ^{51}Cr （クロム）でラベルし、その標的細胞からの ^{51}Cr の遊離を γ カウンターで測定することで活性化能を調べる。この方法はキラー活性を調べる一般的な方法で、かつ感度が高く再現性に優れている。抗体産生能はヒツジ赤血球を標的とした補体依存性のブラーク法を用いて検査する。この方法も感度が高く再現性に優れている。サイトカインの産生能はEIA法で検査する。この方法も感度および再現性が優れている。一方、感染治療実験では、マウスにチフス症を起こすSalmonella enteritidis 116-54を感染させ、感染後、1週間目のマウスの生存状態から β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）の生体免疫反応に与える影響を検討する。このマウスチフス症の実験モデルは我々が確立したもので、再現性に優れたマウスの感染実験モデル系である。また、各臓器の細菌数を測定することで、実際の感染状態を数値化して解析することもできる。実際には各臓器（肝臓、脾臓、腸、脳）をホモゼネートし、その一部を寒天平板上にまき、平板上に発育した菌のコロニー（集落）をカウントする方法である。この方法も再現性に優れ、細菌学の分野では頻繁に用いられる方法である。

【0041】以上、本発明の β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）は生体のバランス（生体免疫反応）調節する機能的健康食品や医薬品として安全で、非常にユニークな物性や生理活性をもつ素晴らしい物質であることが判明した。また本実施例に示すように、我々の開発した β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培

養液)に匹敵する機能的健康食品は現在まだ報告されておらず、大変素晴らしい健康食品であることもわかった。この β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)の応用範囲は本実施例で示した医療、保健、福祉、食品、環境分野、さらにはさまざまな産業分野で応用が可能であることが判明した。

【0042】一方、我々が発明した β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)は本発明の実施例にも示すように、既存の β -グルカンには認められない非常にユニークな生理活性を示すと共に、既存の β -グルカン以上の生体のバランス(生体免疫反応)調節機能が備わっている β -グルカンあることが明らかになり、今後、 β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)の各種産業分野での幅広い応用が期待される。 β -1.3-1.6グルカンを主成分とするアウレオバシジウム培養液を製造するために使用した微生物であるFERM P-18099の科学的性質及び分類学の位置と菌学的特徴は次の通りである。

科学的性質及び分類学の位置

(科学的性質)本菌は高粘稠の高分子多糖を産生する。本物質はエタノールで容易に凝集して簡単に回収できる。本多糖は β 型で、主鎖は1,3結合であり、3と6の位置より分岐をもつ酸性多糖である。有機酸としてリンゴ酸、リン酸などのカルボン酸を含有する。又、アルミニウムイオンなどにより容易に凝集する。本物質は飼料として発育促進や排水処理にも有効であり、免疫を有する食品添加物、機能的食品として有効である。

(分類学上の位置)ポテトデキストロース寒天斜面培養上、25℃、7日間培養で黒褐色のコロニーを形成する。コロニー周縁は糸状様発育で次第に淡黒褐色となる。細胞は糸状様で、時に分節孢子、酵母様の出芽分生子、卵形の酵母様単細胞、時として厚膜孢子細胞も形成される。発育温度25℃、グルコース、フラクトース、ガラクトースなどのヘキソース、スクロース、又デンプンを分解する。培養液は顕著な粘稠になる。

菌学的性質から不完全菌類、黒色菌科のAureobasidium pullulansと近縁。分離菌の菌学的特徴

コロニーは初め表面平滑で灰白色、粘液性、光沢のある油滴状(脂肪様)の酵母様に発育し、その周縁から糸状の菌体が放射状に成長し、ちぢれた様な糸状で丁度樹枝状発育をする。この糸状菌体は培地表面のみならず培地中にもよく発育する。しばらくするとコロニー表面に淡暗褐色の斑点が点々と現われ次第に黒色の斑点になり遂に全面が暗黒色となる。この糸状菌体に淡褐色の楕円又は卵形の多数の分生子を側生する。この分生子は容易にばらばらになる。一方油滴状のコロニーの表面にも点々と分生子をつける。糖類を含んだ培養液は非常に粘稠性となり、液面に厚いコロニーで皮革の黒色菌苔を生ずる。最適発育温度は20~25℃でブドウ糖、シヨ糖などの糖類からアルコール類、有機酸類を生成し、又特有

の芳香を有する。

1. 培養的特徴

(イ)固体培地:パレイシヨ、グルコース寒天培地上最初コロニーは表面平滑、透明、光沢ある油滴状、粘稠の灰白色の酵母様で、コロニーの周縁から放射状にちぢれた糸状様の丁度樹枝状の菌体が発育し、この糸状様菌体は培地表面のみならず、培地中にもよく発育する。やがて樹枝様のところどころの部分黒褐色になる。培養して3~4日たつとコロニー表面に淡暗褐色の斑点が点々と現れるが、以後次第に淡暗黒色になり全面に広がり、遂に全体が黒色になる(培養7日)。尚ツアベツク寒天培地上では発育はおそいが培養的特徴は前記の様である。コロニー表面が全面黒色になるのに3週間ぐらいかかる。

(ロ)液体培養:パレイシヨ、グルコース培地中点々と浮遊状態に菌体が発育し(培養3日)、次第にコロニーが増え、やがて(培養7日)液中に粘性のコロニーが充満する。そして管壁に暗褐色の菌苔が現れ、次第に液面にも出来る(培養15日)。この菌蓋はゼラチナスな粘性のある厚いものである。尚ツアベツク培地中にも同様に発育するが非常におそく菌体も少なく、約3週間で液面にかかりの黒色菌苔をつくる。

2. 形態的特徴

若い細胞は透明な糸状のちぢれた樹枝状で、菌体(糸状様)はところどころから黒く卵形の孢子様のものが側生する。又油滴状のコロニーはその中に点々と黒色の孢子様のものが着生する。これは衝撃をあたえたとばらばらになる。

3. 生理的特徴

最適発育温度は20~25℃、グルコース、シユークロースなどから粘性物を生成又グルコースなどの糖類から、アルコール類、有機酸類を生ずる特有の芳香を有する。

【0043】本発明の目的には、本菌を培養した液、即ちアウレオバシジウム(Aureobasidium)培養液がそのまま使用できるが、この培養液を遠心分離にかけた後の上清液が有効に使用される。遠心分離をしないアウレオバシジウム培養液をそのまま利用することによる効果は遠心分離した場合と比較して同等以上である。

【0044】また、本菌をそのまま培養すると黒色となるが、培養時にビタミンEと乳化剤としてレシチンを含んだ培地に培養すると無添加にくらべて、淡黒灰白色となり、黒色化を抑制され、顕著な粘性培養液が得られる。即ち、本菌の生産培地組成は蔗糖1%、米糠0.2%、レシチン0.2%、ビタミンE0.2%、水100ml、pH5.2で、この培養液を1kg/cm²の高圧蒸気殺菌して、本菌を接種し、ジャファーメンターで25℃、0.5ml/min、100rpm、72時間、通気攪拌培養後、1kg/cm²、15分間、高圧蒸気殺菌する。

【0045】<菌の性質と培養技術>

1. アウレオバシジウム培養液中の糖含有量を一定に保つ培養終点の決定方法

従来のAureobasidium. spを用いた多糖溶液であるアウレオバシジウム培養液の製造では、培地に用いる米糠の個体差が影響し、同一培地組成・培養条件・培養時間においても得られる培養液の物性および組成に差が見られた。そこで、アウレオバシジウム培養液特有の物性である粘度の値により培養終点を決定していたが、アウレオバシジウム培養液は一樣の液体ではなく、同一培養時間において多検体の粘度測定を行った場合でも検体毎の値に±5%の差が生じていた。そのため粘度は明確な培養終点の指標とは成り得ず、培養の経時変化を正確に捉えることが難しく、製造毎でアウレオバシジウム培養液に差が生じる原因となっていた。この問題を解決するために、培地中の炭素源と目的生産物の一つである β -1.3-1.6-グルカンの測定値を指標とし、複雑な菌体の代謝を明らかにした。

【0046】培養時における菌の代謝は大きく1) 培養20～50時間に見られる培地中のサッカロースの加水分解。2) 培養45～70時間にみられる分解して得られたグルコースの消費、並びに目的産物の β -1.3-1.6-グルカンの合成。3) 培養55～90時間にみられる分解して得られたフルクトースの消費、並びにブルラン及びオリゴ糖の合成。の3段階に分別できた。これらの実験結果より菌体の成長・代謝には、培地に用いる米糠中の窒素・脂質が大きく関与しており、培養時間が直接炭素源の消費並びに多糖の合成には関係していないことが明らかとなった。又、問題とされていたアウレオバシジウム培養液の物性・組成を大きく左右しているのが、目的産物である β -1.3-1.6-グルカンの合成、並びにブルラン及びオリゴ糖の合成であることが明らかとなった。そこで従来の粘度測定の変わりに、残存グルコース測定により前述2)の代謝が終了していることの確認と、残存フルクトース測定により前述3)の代謝の進行を観察することにより、製造毎において定めた物性・組成のアウレオバシジウム培養液を得ることが出来た。

【0047】2. 菌体のコロニー形成の軽減

従来のAureobasidium. spを用いた製造方法にて得られた、多糖溶液であるアウレオバシジウム培養液中には菌体の大きな塊が見られた。これらの菌体塊はアウレオバシジウム培養液自体の粘性が高いことから取り除くことが難しく、培養液が一樣でない原因の一つであった。この問題を解決すべく、アウレオバシジウム培養液の組成を変化させることなく、菌体塊を減少させることを行った。

【0048】Aureobasidium. spは大きく分け、菌糸体と酵母状の分生子の2形態をとる菌である。問題となる菌体塊は菌糸体により形成されており、菌糸体の成長には窒素源として培地に加える米糠が大きく関係しており、米糠を核として菌体塊を形成することが明らかとなっ

た。又、培養時における菌の代謝は、1) 培養20～50時間に見られる培地中のサッカロースの加水分解。

2) 培養45～70時間に見られる分解して得られたグルコースの消費、並びに目的産物の β -1.3-1.6-グルカンの合成。3) 培養55～90時間に見られる分解して得られたフルクトースの消費、並びにブルラン及びオリゴ糖の合成。の大きく3段階に分別でき、製造の目的である2)の代謝には膨張した酵母状の分生子が関与しており、菌糸体は直接代謝に関係していないことが明らかとなった。

【0049】そこで培地に用いる米糠を細粒状に粉碎することにより、窒素源としての効果をより向上させると同時に、核となる米糠を軽減し大きな菌体塊の形成を抑制することが出来た。また上述の細粉した米糠を用い培養を行った場合、従来法と同程度の培養時間にて、従来の物と同じ組成のアウレオバシジウム培養液を得ることが出来た。

【0050】また、米糠を細粒状に粉碎し、水に混和させ、熱にて殺菌処理した後、静置し得られた上清を用いて菌の培養を行うことにより、更にアウレオバシジウム培養液中の菌体塊形成を抑制することが出来た。更に、熱による殺菌時における米糠の不溶成分の炭化も起こらず、透明度の高い多糖溶液を得ることが出来た。また上述の培地作成方法にて培養した場合、膨張した酵母状の分生子の数が減少するため代謝には従来に比べ時間を要するが、代謝反応自体は進行し、従来のものと同じ組成のアウレオバシジウム培養液を得ることが出来た。

【0051】3. 目的とする β -1.3-1.6-グルカン含有量の増加

従来のAureobasidium. spを用いた製造方法にて得られた、多糖溶液であるアウレオバシジウム培養液中の β -1.3-1.6-グルカン含有量は、全多糖量の1/2量であった。一般的に β -1.3-1.6-グルカンには免疫賦活作用を持つ物が多く見られ、又、Aureobasidium. spが生産する側鎖にリン酸基を持つ β -1.3-1.6-グルカンは天然の凝集剤として働き有用である。そこで、同程度の培養時間にてアウレオバシジウム培養液中の β -1.3-1.6-グルカンの含有のみを特異的に増加させることを目的とし、従来の培養方法の改善を行った。

【0052】Aureobasidium. spは大きく分け菌糸体と酵母状の分生子の2形態をとる菌であり、形態変化は主に栄養の枯渇化により引き起こされる。このため培養開始時に炭素源としてのサッカロースを多く添加した場合には、培養終了に要する時間が増加する結果となった。

【0053】培養時における菌の代謝は、1) 培養20～50時間に見られる培地中のサッカロースの加水分解。2) 培養45～70時間にみられる分解して得られたグルコースの消費、並びに目的産物の β -1.3-1.6-グルカンの合成。3) 培養55～90時間にみられる分解して得られたフルクトースの消費、並びにブルラン及び

オリゴ糖の合成。の大きく3段階に分別でき、目的とする β -1.3-1.6-グルカン(2)の代謝によって得られる。2)の代謝を行うのは膨張した酵母状の分生子であり、その前駆形態は1)の代謝と共に増大する。そこで、培養開始時の培地、もしくは1)の代謝終了時に2)の代謝の直接の炭素源であるグルコースを添加することにより、同程度の培養時間で β -1.3-1.6-グルカン含有量のみを特異的に増加させることが出来た。

【0054】以下に本発明の実施態様の例1~例18を要約して列記する。

【0055】

【発明の実施の態様】【例1】 β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)の物質および最新培養技術を用いたその製法。

【0056】【例2】各種疾病、例えば慢性関節リウマチ、膠原病、新興自己免疫疾患、ウイルス・細菌感染症、各種癌、癌の浸潤、転移、発癌ウイルス、神経疾患、痴呆症、アルツハイマー病、肝臓疾患、肝硬変、ウイルス性肝疾患、原因不明の難病、生活習慣病(糖尿病、高血圧、動脈硬化症、骨粗しょう症など)または日本人に大変多い痔(内外痔核、痔出血)などに対する予防または治療薬としての応用。さらにこれらの疾病の発症や病態解明のための研究用試薬としての応用。 β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)の使用形態は前処理として5,000回転10分間、さらには12,000回転10分間遠心分離した上清を加熱処理で殺菌したものを用いる。

【0057】【例3】各種臨床検査キット(一般検査、生化学検査、病理検査、免疫血清検査など)の補助試薬(緩衝液、検査サンプルの保存安定剤、生理検査の抵抗防止剤など)としての応用。 β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)の使用形態は前処理として5,000回転10分間、さらには12,000回転10分間遠心分離した上清を加熱処理で殺菌したものを用いる。

【0058】【例4】移植後の患者の無菌食への応用。特に骨髄移植後、免疫抑制剤を投与している患者の無菌室での無菌食としての応用。 β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)の使用形態は前処理として5,000回転10分間、さらには12,000回転10分間遠心分離した上清を加熱処理で殺菌したものを用いる。無菌食の場合は上記殺菌したものをさらに加熱滅菌処理を十分に行った無菌的なものを使用する。

【0059】【例5】健康維持および増進のための新規健康補助食品としての応用。特に食事摂取不能や嚥下障害を伴う高齢者、またはリハビリテーションを受ける患者の体力・抵抗力維持のための機能的健康補助食品としての応用。 β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)の使用形態は5,000回転10分間、さらには12,000回転10分間遠心分離した上清を加熱処理で殺菌したものを用いる。

【0060】【例6】女性の健康維持食品としての応用。特に妊産婦、更年期障害を持つ女性の生体バランスを調節するための機能的健康補助食品としての応用。または皮膚などの結合組織を守るコラーゲン類似物質や化粧品としての応用。 β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)の使用形態は5,000回転10分間、さらには12,000回転10分間遠心分離した上清を加熱処理で殺菌したものを用いる。

【0061】【例7】病院内感染防止(環境微生物の繁殖防止)に関わる新規素材としての応用。特に医療従事者の手、指などの消毒剤としての応用。さらに病棟(病室の床の清浄)、入浴不能の患者、寝たきり高齢者の身体の清拭などに関わる新規素材としての応用。 β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)の使用形態は5,000回転10分間、さらには12,000回転10分間遠心分離した上清を加熱処理で殺菌したものを用いる。

【0062】【例8】環境汚染物質除去に関わる新規素材としての応用。特に内分泌攪乱物質(環境ホルモン、ダイオキシン類など)除去のための新規素材としての応用。 β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)の使用形態は5,000回転10分間、さらには12,000回転10分間遠心分離した上清を加熱処理で殺菌したものを用いる。

【0063】【例9】病原微生物の汚染防止に関わる新規素材としての応用。手、指、体表面、性器などに付着する病原微生物の除去、特に性病(淋病、梅毒など)の起因微生物を直接患部に塗布し、病原微生物を除去するための新規素材としての応用。 β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)の使用形態は5,000回転10分間、さらには12,000回転10分間遠心分離した上清を加熱処理で殺菌したものを用いる。

【0064】【例10】各種DNAおよびRNAウイルスを除去するための新規素材としての応用。特にヘルペスウイルス、ポリオウイルス、インフルエンザウイルス、血液を介して感染する肝炎ウイルス(B、C型)、エイズウイルス、腫瘍ウイルスとしてのヒトパピローマウイルスや成人Tリンパ球白血病ウイルスなどの除去(感染防御)の新規素材としての応用。 β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)の使用形態は5,000回転10分間、さらには12,000回転10分間遠心分離した上清を加熱処理で殺菌したものを用いる。

【0065】【例11】紫外線防止のための新規外用素材としての応用。皮膚に悪影響を与え、皮膚癌を起こす物理的因子(紫外線)をカットするための新規外用素材としての応用。特に、スポーツ選手、戸外で働く労働者の日焼け防止の新規素材としての応用。 β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)の使用形態は5,000回転10分間、さらには12,000回転10分間遠心分離した上清を加熱処理で殺菌したものを用いる。

【0066】【例12】 β -1.3-1.6グルカン(アウレオバ

シジウム培養液)の筋肉疲労緩和に対する新規外用素材としての応用。特に、肉体疲労やスポーツ後の肉体疲労物質の経皮的緩和や筋肉疲労や痛みに関わる物質除去の新規素材としての応用。塗布に使用する β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)の使用形態は5,000回転10分間、さらには12,000回転10分間遠心分離した上清を加熱処理で殺菌したものを用いる。

【0067】【例13】アウレオバシジウム培養液に含まれる β -1.3-1.6グルカン以外の新規生理活性物質の同定とその応用。アウレオバシジウム培養液には酵母が産生する β -1.3-1.6グルカン以外の未知の生理活性物質が多く含まれていると推測される。その中から免疫系の調節に関わる新規物質とその遺伝子の同定と応用。アウレオバシジウム培養液中の免疫反応に関わる新規物質の同定とライブラリーの作製。 β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)の使用形態は5,000回転10分間、さらには12,000回転10分間遠心分離した上清を加熱処理で殺菌したものを用いる。

【0068】【例14】アウレオバシジウム培養液に含まれる β -1.3-1.6グルカンのドラッグデリバリーシステム(DDS)としての応用。薬剤の持続的効果を誘導するDDSのための新規物質としての応用。以前はリン脂質を用いたリボソームが薬剤封入として利用されていたが、リボソームの組成や調整が困難なことから、アウレオバシジウム培養液の抗癌剤、抗菌剤、その他の薬剤のDDSとして応用可能である。 β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)の使用形態は5,000回転10分間、さらには12,000回転10分間遠心分離した上清を加熱処理で殺菌したものを用いる。

【0069】【例15】 β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)の生理活性(免疫調節作用)の解明。 β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)の生体免疫反応に与える影響を細胞、分子および遺伝子レベルで解析する。具体的には、細胞数の変化、細胞の形態変化、細胞増殖能、DNA合成能、抗体産生能、各種サイトカインの産生能、細胞膜表面分子の動態変化、細胞内セカンドメッセンジャーの動態解析を行う。 β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)の使用形態は5,000回転10分間、さらには12,000回転10分間遠心分離した上清を加熱処理で殺菌したものを用いる。

【0070】【例16】 β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)の生理活性評価のための新しいシステムの開発と確立、およびさまざまな構造をもつ β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)アナログの作製。さまざまな構造をもった1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)アナログを各種サイトカイン(特にインターロイキン-8: IL-8)の動態を指標とした評価システムを開発。評価指標としてのIL-8の動態変化は細胞培養液中、血液中、尿中で定量を行うことで検討する。 β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養

液)の使用形態は5,000回転10分間、さらには12,000回転10分間遠心分離した上清を加熱処理で殺菌したものを用いる。

【0071】【例17】 β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)の作用機序の解明。免疫反応を指標とした β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)の作用機序の解明のためのシステムの開発と確立。特にin vitroの培養系を用いて、1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)の作用機序を細胞内セカンドメッセンジャーの動態を指標に解析。細胞内の Ca^{2+} の動態や細胞内取込み、各種リン酸化酵素群(キナーゼ)特に、protein kinase C (PKC)、protein kinase A (PKA)、p protein tyrosine kinase (PTK)、核内および細胞質内タンパク質、細胞の代謝経路に関わる解糖系の最終リン酸化酵素glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: GAPDH)の動態、免疫系の反応に重要な役割をするサイトカインの動態などを指標に β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)の作用機序を解明。アナログの効果を各種サイトカイン(特にインターロイキン-8: IL-8)の動態変化を指標とした評価システムの開発。評価マーカーとしてのIL-8の動態変化は細胞培養液中、血液中、尿中の定量を行うことで検討する。 β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)の使用形態は5,000回転10分間、さらには12,000回転10分間遠心分離した上清を加熱処理で殺菌したものを用いる。

【0072】【例18】 β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)の実験動物を用いての生体免疫活性作用の解析。腫瘍免疫としての解析は免疫活性作用(キラーT細胞活性、NK細胞活性、抗体産生能、サイトカインの産生能など)の誘導として解析。感染免疫としての解析はマウスチフス症治療としての解析。生体投与に使用する β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)の使用形態は5,000回転10分間、さらには12,000回転10分間遠心分離した上清を加熱処理で殺菌したものを用いる。

【0073】以下に本発明の実施例を示す。

【0074】

【実施例】<実施例1> β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)の末梢血リンパ球に与える影響
健康人血液からFicoll-Conray法で末梢血リンパ球を分離した。次に各種濃度の β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)を添加し、6~7日間、37℃で培養した。培養後、リンパ球数を血球計算盤を用いて計測した。その結果、図1に示すように、ある一定濃度の β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)は末梢血リンパ球の数を対照群(β -1.3-1.6グルカン無添加群)と比べて約1.2~1.5倍の増加させる傾向があった。また、3年以上 β -1.3-1.6グルカン(アウレオバシジウム培養液)を飲み続けている健康人から末梢血リンパ球を取り出し、試験管の中で再び至適濃度の β -1.3-1.6グル

カン（アウレオバシジウム培養液）を添加し、その形態変化を検討したところ、 β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）添加群は無添加群に比べて著明な細胞のプラスト化（細胞分裂像と細胞凝集）が認められた（図2：写真）。

【0075】＜実施例2＞ β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）のIgG抗体産生能に与える影響
健康人血液から型のごとく末梢血リンパ球を分離した。次に各種濃度の β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）を添加し、7日間、37℃で培養した。培養

後、培養上清中の抗体（IgG）の濃度を酵素抗体法（2抗体enzyme immunoassay: EIA法）で調べた。その結果、表1に示すように β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）は末梢血リンパ球のヒトIgG抗体の産生には直接影響を与えなかった。この結果は β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）が生体で副作用を起こしにくいことを示唆するものである。

【0076】

【表1】

表1. β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）のIgG抗体産生能に与える影響

β -1.3-1.6グルカンの濃度(mg/ml) (アウレオバシジウム培養液)	IgG抗体産生濃度(ng/ml)
0	668
7.5	835
0.75	592
0.35	663
0.18	553

【0077】＜実施例3＞ β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）のサイトカイン産生に与える影響
(1)

健康人末梢血リンパ球に一定濃度(400倍希釈)の β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）を添加し、5日間、37℃で培養した。培養後、培養上清中のサイトカイン（インターロイキン1 β : IL-1 β とインターロイキン: IL-2)の濃度を酵素抗体法（enzyme immunoassay:

EIA法）で調べた。その結果、表2に示すように β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）添加群、無添加群ともその産生量に著しい差は認められなかった。この結果は β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）が生体で副作用を起こしにくいことを示唆するものである。

【0078】

【表2】

表2. β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）のサイトカイン産生に与える影響

培養	サイトカイン	
	IL-1 β (pg/ml)	IL-2 (U/ml)
無添加	<10	<0.8
β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) 添加	<10	<0.8

【0079】＜実施例4＞ β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）のサイトカイン産生に与える影響
(2)

単球系モデル細胞株(U937)に一定濃度(20倍希釈)の β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）を添加し、2~4日間、37℃で培養した。培養後、培養上清中の各種サイトカイン（インターロイキン1 β : IL-1 β 、インターロイキン-4: IL-4、インターロイキン-2: IL-2、

インターロイキン6: IL-6、インターフェロン γ : IFN- γ)の濃度を酵素抗体法（enzyme immunoassay: EIA法）で調べた。その結果、表3に示すように β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）添加群は無添加群と比較してIL-6の産生量が約20倍以上認められた。

【0080】

【表3】

表3. β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) のサイトカイン産生に与える影響

培養	サイトカイン				
	IL-1 β (pg/ml)	IL-2 (U/ml)	IL-4 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IFN- γ (U/ml)
無添加	<10	<0.8	<2.0	2.0	<0.1
β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) 添加	<10	<0.8	<2.0	49.5	<0.1

【0081】<実施例5> β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) の細胞分裂 (DNA合成能) に与える影響

健康人末梢血リンパ球および骨髄移植後の患者リンパ球に400倍希釈の β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) を添加し、5日間、37℃で培養した。5日後、トリチウムサイミジン(1 μ Ci)を加え、 β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) の末梢血リンパ球に与える細胞分裂能 (DNA合成能) を調べた。その結果、

表4に示すように、 β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) 添加群は無添加群に比べて健康人由来の末梢血リンパ球のDNA合成能を平均約4.5倍亢進させることがわかった。一方、骨髄移植後の患者の場合にも部分的ではあるが β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) の添加で細胞分裂を促進する症例も認められた (表5)。

【0082】

【表4】

表4. β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) のDNA合成能に与える影響 (健康人末梢血リンパ球の場合)

健康人末梢血 リンパ球	DNA合成能 (cpm)		SI (刺激指数)
	無添加	β -1.3-1.6グルカン添加 (アウレオバシジウム培養液)	
SA	624	851	1.4
TS	444	2067	4.7
YA	460	1232	2.7
IS	238	2177	9.1

cpm: count per minute SI: stimulation index

【0083】

【表5】

表5. β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) のDNA合成能に与える影響 (骨髄移植患者末梢血リンパ球の場合)

		DNA合成能	
		刺激指数 (SD)	
		β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) の刺激	
骨髄移植患者の 末梢血リンパ球	移植形態	1次刺激	2次刺激
SU	骨髄移植患者	同種骨髄移植	2.7
AI	骨髄移植患者	同種骨髄移植	3.6
KM	骨髄移植患者	同種骨髄移植	3.6
NO	骨髄移植患者	自家骨髄移植	2.3
TM	骨髄移植患者	同種骨髄移植	1.2
ZT	骨髄移植患者	自家骨髄移植	2.0
YK	さい帯血移植患者	同種移植	1.0
SF	さい帯血移植患者	同種移植	1.2

【0084】<実施例6> β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) の培養白血病細胞株の増殖に与える影響

各種培養白血病細胞株に β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) (20倍希釈) を添加し、1~3日間、37℃で培養した。培養後、細胞数を血球計算盤を用いて

計測し、 β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) の白血病細胞株の増殖に対する影響を検討した。その結果、図3、図4、図5、図6に示すように β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) は今回使用した白血病細胞株の増殖を抑制した。さらにその一部はアポトーシス (アポトーシス) が関与する所見も認められた。

【0085】＜実施例7＞ β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）の単球/マクロファージモデル系細胞表面分子（レセプター分子）の動態に与える影響
単球/マクロファージモデル系細胞株(U937)に β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）（20倍希釈）を添加し、24時間、37℃で培養した。24時間後、細胞を回収し、各種ヒト細胞膜抗原（レセプター：CD抗原）の動態を各種モノクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法（フローサイトメトリー法）で解析した。今回は特に免疫系に密接に関与する接着分子に注目し、その動態で検討した。その結果、図7に示すように、 β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）で培養された単球/マクロファージモデル系細胞（U937）の細胞表面のCD11aおよびCD49d分子の発現抑制（down-regulation）が認められた。

【0086】＜実施例8＞ β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）の環境微生物増殖抑制効果
医療・保健・福祉の分野での応用の一つとして生体に付着している環境微生物の除去は院内感染を防止する意味でも重要な課題である。そこで、 β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）に手、足、身体に付着した環境微生物の増殖を防止する効果があるのかどうかバームスタンプ（手のひら用）を用いて検討した。実験群を2群設けて実験を行った。実験群1は対照群で、そのまま手をバームスタンプにつけ、約20秒間接触させた。一方、実験群2は β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）で手のひらを拭き、乾くまで約5分間放置した。放置後、実験群1と同様に手をバームスタンプに手のひらをつけ約20秒間接触させた。1～2日間、室温で培養し、微生物の増殖（コロニー数）を観察し、手ひらの環境微生物による汚染度を検討した。図8はその結果を示したものである。結果に示すように β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）で手のひらを拭かなかった対照群は数多くの環境微生物が検出されたが、 β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）で手を拭き、乾くまで放置しておいた実験群からはほとんど微生物のコロニーが検出されなかった。これは β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）に環境微生物の増殖を抑制する作用があること示している。携帯用の消

毒剤として、あるいは高齢者で入浴不可能な人の体の清拭、さらには病院内感染防止、環境汚染物質の除去に役立つものと考えられる。

【0087】＜実施例9＞ β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）の病原微生物の増殖抑制効果
 β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）の病原微生物に対する増殖抑制効果を寒天平板法を用いて検討した。病原性微生物としては大腸菌（*Escherichia coli*：ATCC8739）、黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*：IK012732）、緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*：IK013736）、サルモネラ菌（*Salmonella enteritidis* 116-54）を使用した。各微生物をトリプトイオン液で37℃で一晩培養した。培養後、その一定量を滅菌生理食塩水で希釈した。次に希釈された菌液0.5mlに、 β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）2mlを添加し、10分、30分、1時間、2時間、4時間、24時間放置した。放置後、その0.05mlをトリプトソイ寒天平板（普通寒天培地）に入れ、コンラージ棒で塗り広げ、1～2日間培養した。培養後、微生物の増殖（コロニー数）をコロニーカウンターで計測し、 β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）の病原微生物の増殖に与える影響を検討した。表6はその結果を示したものである。結果に示すように β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）を添加し、30分から微生物の増殖抑制効果が見られ、1～2時間には大半の微生物の増殖が抑制された。また4時間には完全に微生物の増殖が抑制された。表6に示すように、緑膿菌、黄色ブドウ球菌の増殖が抑制されることは、病院内感染予防や免疫力の低下した人に発症しやすい日和見感染症を予防できることを示している。また、 β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）が大腸菌とサルモネラ菌の増殖を抑制することから、食中毒を防ぐための新規素材としても有効である。さらに、 β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）にこれらの病原微生物の増殖を抑制する作用があることから例えば、皮膚の消毒、また近年再び問題になってきた性病（梅毒、淋病など）の予防などに応用できると考えられる。

【0088】

【表6】

表6. β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) の病原微生物の増殖抑制効果

処理時間	菌数/プレート							
	大腸菌		緑膿菌		サルモネラ菌		黄色ブドウ球菌	
	無処理	処理	無処理	処理	無処理	処理	無処理	処理
0 分	220	122	654	2	896	590	201	148
10 分	210	68	704	0	960	356	233	101
30 分	218	33	616	0	912	168	210	108
1 時間	220	9	512	0	972	11	239	68
2 時間	223	0	460	0	952	7	229	18
4 時間	255	0	284	0	986	1	232	4
24時間	無数	0	383	0	1072	0	160	0

無処理 : 生理的食塩水

処理 : β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液)

使用菌株

大腸菌	<i>Escherichia coli</i>	ATCC8739
緑膿菌	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	IKO13736
サルモネラ菌	<i>Salmonella enteritidis</i>	116-54
黄色ブドウ球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	IKO12732

【0089】<実施例10> β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) のウイルス感染防御効果

β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) のウイルス感染防御効果をポリオウイルスの感染実験を用いて検討した。Hela細胞 (子宮頸部癌由来) を24穴マイクロプレートに細胞シートができるまで培養した。実験群は細胞に β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) を5%になるように添加した実験群と β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) を添加しない実験群を設けた。次に一定感染力価を持ったポリオウイルス液をそれぞれの実験群に加え、1時間、37℃で培養した。数日間培養後、ポリオウイルスによるHela細胞の細胞変性効果 (cytopathic effect: CPE) を観察した。図9 (写真) に示すように β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) はポリオウイルスのHela細胞への細胞変性効果を著明に抑制した。このことは β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) がポリオウイルスのHela細胞表面上のポリオウイルスレセプター (CD31分子) への吸着を阻止し、感染を防御した所見である。

【0090】<実施例11> β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) の紫外線照射による細胞死の抑制効果

β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) の紫外線防止 (カット) 効果を検討した。実施例11と同様に、Hela細胞を細胞シートができるまで培養した。培養後、5倍、10倍、20倍希釈の β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) を添加した実験群と、 β -1.3-

1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) を添加しない群を設け、紫外線 (クリーンベンチ付属紫外灯を使用) を一晩、30cmの距離から照射した。照射後、37℃の孵卵器で培養を続け、72時間後の各実験群における細胞の細胞数を計測し、 β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) の紫外線防止効果を検討した。また、細胞の形態変化は位相差顕微鏡で観察し、写真撮影した。図10に示すように、10倍、20倍希釈の β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) を添加した実験群は細胞の形態が維持され、その増殖にはほとんど影響がなかった。一方、 β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) を添加していない実験群は細胞の変性が認められ、著しい細胞の減少 (細胞死) が認められた (表7)。この結果は紫外線照射による細胞の死 (アポトーシス) が β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) によって抑制されたためである。皮膚に悪影響を与え、皮膚がんを起こす物理的因子である紫外線をカットできる新規外用素材として応用可能であることを示唆すると共に戸外で働く労働者、スポーツ選手、また夏の海水浴シーズンでの日焼け防止に対して応用が期待できる。また、筋肉疲労除去に対する新規外用薬 (軟こう) として、肉体疲労物質 (痛み物質やそれに関わる物質) の経皮的緩和や除去に関する新規素材としての応用も可能であると考えられる。

【0091】

【表7】

表7. β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) の紫外線による細胞死の抑制効果

培養	紫外線照射	細胞数 ($\times 10^5$)
無添加	-	2.5
無添加	+	1.2
β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) 添加 (10倍希釈)	+	2.8
β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) 添加 (20倍希釈)	+	2.6

【0092】<実施例12> β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) の細胞の形態変化に与える影響
単球系細胞株(U937)に20倍希釈の β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) を添加し、2~3日間、37℃で培養した。培養後、細胞の形態を位相差顕微鏡下および電子顕微鏡(SEM)下で観察し、写真撮影した図11に示すように、 β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) で培養した細胞はその形態変化が認められた。また電子顕微鏡での観察 (図12) から、 β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) で培養した細胞は β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) で培養していない対照群と比較して細胞の表面に多くの突起物 (ラッフル構造) が認められた。この結果は β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) によって細胞の活性化が認められたことを示している。

【0093】<実施例13> β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) の培養細胞株(U937)のDNA合成能に与える影響
 β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) のU9

37細胞に対するDNA合成能をトリチウムサイミジン (3H-thymidine) の取込みを用いて測定した。U937細胞に20倍希釈の β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) を添加し、1~2日間、37℃で培養した。培養後、トリチウムサイミジン (1 μ Ci) を加え、 β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) のU937細胞に対する細胞分裂能 (DNA合成能) を調べた。その結果、表8に示すように、 β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) 添加群と無添加群との間にはDNA合成能に著明な差異は認められなかった。一方、リン酸化酵素であるprotein kinase C (PKC) の活性化剤であるphorbol myristate acetate (PMA) はU937細胞のDNA合成能を著明に抑制した。この結果は β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) は人末梢血リンパ球と違って、癌細胞化した培養細胞株に対しては、DNA合成能には影響を与えないことが判明した。

【0094】

【表8】

表8. β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) の培養細胞株(U937)のDNA合成能に与える影響

培養	DNA 合成能	
	トリチウムサイミジンの取り込み (cpm)	
	24 時間	48 時間
無添加	273438 \pm 38620*	549601 \pm 28143
アウレオバシジウム培養液	224876 \pm 8815	568890 \pm 34386
PMA	1579 \pm 218	858 \pm 51

* 平均 \pm SD.

【0095】<実施例14> β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) の培養細胞株(U937)細胞表面抗原に与える影響

単球/マクロファージモデル系細胞株(U937)に β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) (20倍希釈) を添加し、96時間、37℃で培養した。培養後、細胞を回収し、各種ヒト細胞膜レセプター分子 (CD抗原) の動態を各種モノクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法 (フローサイトメトリー法) で解析し、陽性率 (%) と蛍光強度 (mean fluorescence intensities : MFIs) を算出した。MFIs 指数 (MFIs index) は次の式 { (MFIs of test sample) \div (MFIs of medium control) } で計算した。

今回は特に免疫系に密接に関与する接着分子に注目し、その動態を検討した。その結果、表9および図13に示すように、 β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) で培養されたU937細胞は細胞表面上のCD11b、CD54、C1qR分子の発現増強 (up-regulation) が認められた。いずれも生体免疫を調節するための非常に重要な分子である。CD11bやC1qR分子は細菌などの食食作用や癌細胞の破壊に対して機能的に働く分子である。また、CD54分子は生体免疫を誘導するための接着系の分子である。これらの分子の発現が増強されたことは β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) によって生体の免疫反応が高められたことを意味する。

【0096】

【表9】

表9. β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) の培養細胞株(U937)細胞表面抗原に与える影響

抗体	抗体アイソタイプ	レセプター分子	MFI index (蛍光強度指数)
OKT-4	IgG2b	CD4	0.79
OKT-8	IgG2b	CD8	0.80
mNI-58A	IgG1	CD11a	1.61
SPV-L7	IgG1	CD11a	1.47
Bear-1	IgG1	CD11b	2.20
Leu15	IgG2a	CD11b	2.28
MY-4	IgG2b	CD14	0.87
AHN1.1	IgM	CD15	0.94
Leu11b	IgG	CD16	0.86
HuLy-m13	IgM	CD17	0.94
IB4	IgG2a	CD18	1.12
H107	IgG2b	CD23	1.10
BA-1	IgM	CD24	0.92
IL-2R1	IgG2a	CD25	1.02
4B7R	IgG1	CD29	1.12
L133.1	IgG1	CD31	1.30
2H4	IgG1	CD45R	1.27
L25.3	IgG2b	CD49d	1.43
LB-2	IgG2b	CD54	2.38
YH370	IgG	CD54	2.22
E1A6	IgG1	CD106	1.05
Mike β 1	IgG2a	CD122	0.86
Sa-3	IgG3	HLA-class II	0.89
mNI-11	IgG1	C1qRp	2.07

【0097】<実施例15> β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) の培養細胞株 (HL-60) 細胞表面抗原の動態に与える影響

組織球系モデル細胞 (HL-60) に β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) (20倍希釈) を添加し、24時間、37℃で培養した。培養後、細胞を回収し、各種ヒト細胞膜レセプター分子 (CD抗原) の動態を各種モノクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法 (フローサイトメトリー法) で解析した。培養後、細胞を回収し、各種ヒト細胞膜抗原 (レセプター: CD抗原) の動態を各種モノクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法 (フローサイトメトリー法) で解析し、陽性率 (%) と蛍光強度 (mean fluorescence intensities : MFIs) を算出した。MFI s 指数 (MFIs index) は次の式 { (MFIs of test sample) \div (MFIs of medium control) } で計算した。今回は特

に免疫系に密接に関与する接着分子に注目し、その動態で検討した。その結果、表10および図14に示すように、 β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) で培養されたHL-60細胞の細胞表面上のCD15、CD54分子の発現増強 (up-regulation) が認められた。いずれも生体免疫を調節するための非常に重要な分子である。CD15分子は大腸菌を貪食するためのレセプターで、この分子が発現増強することはHL-60細胞が大腸菌を効率良く貪食し、大腸菌を消化できることを示している。また、U937細胞と同様にCD54分子は生体免疫を誘導するための接着系の分子で、この分子の発現が増強されたことは β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) に生体の免疫反応を高める作用があることを意味する。

【0098】

【表10】

表10. β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) の培養細胞株(HL-60)細胞表面抗原に与える影響

抗体	抗体アイソタイプ	レセプター分子	MFI s index (蛍光強度指数)
mNI-58A	IgG1	CD11a	1.21
Bear-1	IgG1	CD11b	1.11
Leu15	IgG2a	CD11b	1.25
AHN1.1	IgM	CD15	2.58
Leu11b	IgG	CD16	1.22
HuLy-m13	IgM	CD17	1.08
BA-1	IgM	CD24	0.76
IL-2R1	IgG2a	CD25	0.88
4B7R	IgG1	CD29	1.16
L133.1	IgG1	CD31	0.98
BU49	IgG1	CD49d	0.94
LB-2	IgG2a	CD54	2.61
YH370	IgG	CD54	2.43
mNI-11	IgG1	C1qRp	0.99

【0099】＜実施例16＞ β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）のサイトカイン（IL-8）産生能単球/マクロファージモデル系細胞株（U937）に β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）（20倍希釈）を添加し、24時間、37℃で培養した。培養後、培養上清中のサイトカイン（IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IFN- γ ）の量を酵素抗体法（enzyme immunoassay: E

IA法）で調べた。その結果、表11に示すように β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）添加群ではIL-8の著しい産生が認められた。この結果は β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）が生体免疫反応を高める作用があることを示している。

【0100】

【表11】

表11. β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）のIL-8産生に与える影響

培養	サイトカイン					
	IL-1 β (pg/ml)	IL-2 (U/ml)	IL-4 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)	IFN- γ (IU/ml)
無添加	<10	<0.8	<2.0	<0.2	12.6	<0.1
β -1.3-1.6グルカン （アウレオバシジウム培養液）添加	<10	<0.8	<2.0	0.4	100.7	<0.1

【0101】＜実施例17＞ β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）のヒト末梢血単核球からのIL-8産生

健康ヒト末梢血リンパ球を1%正常ヒト血清（human serum:HS）に浮遊し、100倍希釈の β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）を添加し、37℃で8時間、24時間培養した。培養後、培養上清中のIL-8の濃度をEIA法で調べた。その結果、表12に示すように β -1.3-1.6グル

カン（アウレオバシジウム培養液）添加群は早期にIL-8の産生が認められ、無添加群として約2倍の産生を示した。この結果は β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）が生体免疫反応を増強していることを示している。

【0102】

【表12】

表12. β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）のIL-8産生に与える影響

培養	IL-8産生能(pg/ml)	
	8時間	24時間
無添加	1263.2	10877.2
アウレオバシジウム培養液添加	2062.6	22017.5

【0103】＜実施例18＞ β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）の作用メカニズム、特に細胞内セカンドメッセンジャーの動態に与える影響

β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）の作用メカニズムをIL-8産生能を指標に、細胞内セカンドメッセンジャーの動態を用いて測定した。U937細胞に20倍希釈の β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）と、至適濃度の薬剤（細胞内セカンドメッセンジャーの阻害剤）を添加し、1～2日間、37℃で培養した。培養後、IL-8産生能をEIA法を用いて測定し、 β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）の作用機序を解析した。表13に示すように β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）によるIL-8の産生にはリン酸化酵素であるprotein-kinase C (PKC)、protein tyrosine kinase (PTK)、Ca²⁺の細胞内流入が関与していることがわかった。このことは、 β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）の作用には各種リン酸化酵素とカルシウムイオンが密接に関与していることが判明し

た。また、 β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）のPTK活性誘導能をリン酸化PTKに対するモノクローナル抗体（PY-20）を用いたEIA法を用いて測定した。20倍希釈のアウレオバシジウム培養液で24時間培養したU937細胞を細胞溶解緩衝液（lysis buffer）で溶解し、可溶性タンパク質を抽出した。この可溶性タンパク質中に含まれるPTK量をEIA法を用いて測定し、その吸光度を450nmで計ることでPTK量として評価した。表14に示すように、 β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）で培養したU937細胞は対照群と比較して、PTK活性が約1.5倍上昇した。以上の結果から、 β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）の作用メカニズムは主にリン酸化酵素であるprotein-kinase C (PKC)、protein-tyrosine kinase (PTK)、Ca²⁺の細胞内流入が関与していることが判明した。

【0104】

【表13】

表13. β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) の作用機序

培養	薬剤の濃度	薬剤の標的	IL-8 (pg/ml)	
			24時間	48時間
無添加			18.6	20.1
アウレオバシジウム培養液			43.9	74.2
アウレオバシジウム培養液+Go6878	(3.3 μ M)	PKC	4.2	24.8
アウレオバシジウム培養液+herbimycinA	(100 ng/ml)	PTK	15.3	83.2
アウレオバシジウム培養液+cyclosporin A	(10 μ g/ml)	Calcineurin	22.3	181.8

【0105】

【表14】

表14. β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) のPTK活性に与える影響

培養	6 O.D.値	PTK活性(U)/2.5x10 ⁶ (24時間)
無添加	0.411	11.1
アウレオバシジウム培養液添加	0.702	19.5

【0106】＜実施例19＞ β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) 効果の評価システムの確立
 β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) の生体での効果を評価するためのシステムの開発と確立を行った。培養細胞株 (U937細胞) に一定希釈の1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) を添加し、24~72時間培養した。培養後、培養上清を採取し、培養液に含まれるサイトカイン (インターロイキン8; IL-8) の産生量をEIA法 (IL-8検出キット: TFB社) を用いて測定した。表15に示すように、 β -1.3-1.6グルカン (アウレオ

バシジウム培養液) を添加すると非添加群に比較して、著明なIL-8の産生が認められた。このIL-8の産生は高感度で再現性に優れてしるため、 β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) の生体での効果を判定するための評価系として利用できることを意味している。また、各種構造を持つ β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) アナログの作用効果を評価するためのスクリーニングシステムとして有益であると考えられる。

【0107】

【表15】

表15. β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) 効果の評価システムの確立

培養		IL-8 (pg/ml)		
		24 時間	48 時間	72 時間
無添加		15.0	17.1	11.8
LPS	(40 μ g/ml)	2825.9	5454.5	2500.0
PMA	(200ng/ml)	415.6	6048.8	18722.9
アウレオバシジウム培養液	(1:20)	148.5	338.6	159.1
アウレオバシジウム培養液	(1:40)	39.0	58.1	32.7
アウレオバシジウム培養液	(1:80)	39.0	51.1	27.5

LPS: lipopolysaccharide PMA: phorbol myristate acetate

【0108】＜実施例20＞ β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) に含まれる免疫関連物質の同定
 β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) に含まれる免疫関連物質の同定を試みた。アウレオバシジウム培養液を炭酸緩衝液 (pH9.6) で200倍に希釈し、その0.1mlをEIA用96穴マイクロプレートに分注し、4℃で一晩静置した。静置後、穴をリン酸緩衝液 (PBS) で3回洗浄し、2%ドライミルク/PBSを0.2ml添加し、非特異的反応をブロックした。穴をPBSで洗浄した後、免疫関連分子に対するモノクローナル抗体を至適濃度に希釈し、各穴に0.05ml添加した。添加後、4℃で一晩静置した。静置後、再び穴をPBSで洗浄後、至適濃度に希釈したペルオ

キシダーゼ (POD) 標識ヤギ抗マウスIgを添加し、室温で2時間放置した。2時間後、再び穴をPBSで洗浄後し、基質液を加え、10~30分反応させた。反応後、0.1NのHClを添加し、反応を停止し、波長 (450nm) で吸光度を測定し、モノクローナル抗体の反応性と β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) に含まれる免疫関連物質を同定した。表16に示すように、アウレオバシジウム培養液中には β -1.3-1.6グルカン以外に免疫反応に重要な役割を果たすCD24とmNI-37分子が含まれていることがわかった。

【0109】

【表16】

表16. β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) に含まれる免疫関連物質の同定

抗体	レセプター分子	抗体アイソタイプ	抗体の反応性
			O.D.(450nm)
None	-	-	0.015
NMlg	-	IgG+IgM	0.041
OKT-4	CD4	IgG2b	0.016
OKT-8	CD8	IgG2b	0.028
25.5.1	CD11a	IgG1	0.016
NI-58A	CD11a	IgG1	0.116
HV-6	CD11a	IgG1	0.020
SPV-17	CD11a	IgG1	0.028
Leu11c	CD11b	IgG1	0.025
Leu16	CD11b	IgG2a	0.018
LeuM5	CD11c	IgG2b	0.016
MY-4	CD14	IgG2b	0.015
AHN1.1	CD15	IgM	0.054
B-1	CD20	IgG1	0.017
H107	CD23	IgG2b	0.022
BA-1	CD24	IgM	0.244
IL-2R-1	CD25	IgG2a	0.106
mAb13	CD29	Rat IgG2a	0.018
L133.1	CD31	IgG1	0.002
2H4	CD45R	IgG1	0.036
L25.3	CD49d	IgG2b	0.019
LB-2	CD54	IgG2b	0.029
HNK-1	CD57	IgM-biotin	0.051
E1/6	CD106	IgG1	0.050
Mik β 1	CD122	IgG2a	0.017
Sa-3	HLA-class II	IgG3	0.031
PCA-1	-	IgG2a	0.017
B5(5D6)	-	IgM	0.021
mNI-11	-	IgG1	0.065
mNI-37	-	IgM	0.287
anti-LPS	LPS*	IgM	0.032

*LPS: lipopolysaccharide

【0110】<実施例21> β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) 長期摂取者のリンパ球表面分子 (レセプター) の変化

β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) を3年以上摂取者の血液からFicoll-Conray法で型のごとくリンパ球を分離し、10%FCS-RPMI1640培地に 1×10^6 個/mlになるように浮遊し、その0.1mlを96穴マイクロプレートに分注した。次に一定濃度に希釈したアウレオバシジウム培養液を加え、37℃で数日間培養した。培養後、リンパ球の形態、特に細胞凝集を位相差顕微鏡下で観察し、写真撮影した。また、至適濃度の β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) で7日間培養したリンパ球を回収し、免疫反応に関わる分子に対するモノクローナル抗体で染色し、フローサイトメーター法で解析した。表17に示すように、 β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) を長期に摂取した人のリンパ球は至適濃度の β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) を添加すると、著明に細胞間凝集反応を誘導することが判明した (図2参照)。これは2次免疫反応の結

果を示しており、 β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) を長期に摂取することで、生体内に β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) 抗原特異的なTリンパ球のレパートリーが選別され、Tリンパ球表面上に β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) 特異的なTリンパ球レセプターが形成されたものと考えられる。一方、リンパ球の細胞表面分子 (レセプター) はインターロイキン-2 (IL-2) レセプター (CD25分子) の発現増強が認められた。さらにCD4とCD8分子の割合 (CD4/CD8比) が5.9と健常人の比率 (0.6~2.9) より著明に亢進していた。この結果からCD4陽性Tリンパ球 (ヘルパーTリンパ球) が β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) を長期に摂取することで著明の増加していることがわかった。すなわち、 β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) を長期に摂取することで免疫力を高めることが可能であることを示している。

【0111】

【表17】

表17. β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) 長期採取者のリンパ球表面分子 (レセプター) の動態

抗体	レセプター分子	陽性率 (%)		
		培養前	培養7日後	正常値(%)
None		0.14	0.09	
OKT-4	CD4	28.0	16.2	25~56
OKT-8	CD8	4.52	5.94	17~44
NI-58	CD11a	46.3	34.8	77~95
IL-2R-1	CD25	37.3	34.9	1~5
LB-2	CD54	0.97	0.41	ND
Se-3	HLA-class II	25.9	25.6	9~34

*CD4/CD8比=5.9 (正常値 0.6~2.9) ND: not done.

【0112】

【発明の効果】この発明によって製造された β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) は従来知られている β -グルカンとは全く異なる以下の (I) ~ (X) に示す非常にユニークな物性や生理活性を持つことが判明した。

【0113】(I) 生体の免疫反応に与える影響としては、ヒト末梢血リンパ球数の増加、細胞分裂 (DNA合成能) の誘導、さまざまな免疫反応を調節しているサイトカイン (インターロイキン6: IL-6) の産生を誘導することが明らかになった。

【0114】(II) β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) は癌細胞、特に血液の癌である白血病細胞株の増殖を効果的に抑制した。これには部分的に細胞死 (プログラム死: アポトーシス) が関与していた。 β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) が直接癌細胞に作用し、細胞死を誘導することは癌の臨床治療の可能性を示唆するものである。特に、直接 β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) を患部に投与できる腫瘍や癌細胞には効果が期待できる。

【0115】(III) β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) が単球系モデル細胞 (U937) に発現する接着分子 (インテグリン系) CD11aおよびCD49d分子の発現を抑制することがわかった。これは非常に興味ある所見で、特にCD11a分子は小児の下痢症を起こすロタウイルスのレセプター分子であることから、本実施例に示すように、 β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) がロタウイルスの感染を防止できることを意味している。さらに、この結果は β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) がワクチンとして効果を有していることも意味している。一方、CD49d分子もインテグリン系の接着分子で、生体の免疫反応を調節するための非常に重要な分子である。特に慢性関節リウマチ患者の関節滑膜への浸潤Tリンパ球にはこの分子が強く発現している。CD49d分子もCD11a分子と同様、 β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) によってその発現が抑制 (down-regulation) されることは β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) が抗炎症剤であるス

テロイド系の薬剤と同様な効果があることを意味している。 β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) が慢性関節リウマチや各種自己免疫疾患の治療に利用できることを強く示唆された。

【0116】(IV) 免疫はさまざまなネットワークを形成し、情報を交換している。その情報交換には細胞膜表面にある分子 (レセプター) とそれに対するリガンドで制御されている。本実施例では2種類のモデル培養細胞株 (U937とHL-60) を用いて、 β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) の免疫反応における細胞表面分子 (レセプター) の動態を検討した。その結果、 β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) で培養されたU937細胞は細胞表面上のCD11b、CD54およびC1qR分子の発現が増強 (up-regulation) された。CD11bやC1qR分子は細菌を貪食したり、癌細胞を破壊したりする際に機能的に働く分子である。また、CD54分子は生体免疫反応を誘導するための接着分子で、この分子の発現が増強されたことは β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) に生体の免疫反応を高める作用があることを示している。一方、 β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) はHL-60細胞表面上のCD15、CD54分子の発現増強 (up-regulation) も誘導した。CD15分子は大腸菌を貪食するためのレセプターで、この分子がup-regulationすることは β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) がHL-60細胞に大腸菌を貪食するための能力を付与したことを意味している。また、U937細胞と同様、CD54分子の発現が増強したことは β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) に生体の免疫反応を高める作用があることを示している。これらの実施例から β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) には免疫反応を調節するための分子をコントロールする作用があることが判明した。

【0117】(V) β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) の新規評価システムを開発した。この評価システムは生体免疫反応に密接に関与するサイトカイン (インターロイキン-8: IL-8) の動態に着目したものである。本実施例でも示すように、 β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) を添加すると非添加群に

比較して、著明なIL-8の産生が認められた。このIL-8の産生は常に一定の結果を与えることから、 β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）の効果を評価するためのシステムとして、またさまざまな構造を持つ β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）アナログの作用を評価するためのスクリーニングシステムとして有益であると考えられた。

【0118】(VI) β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）が環境微生物の増殖を抑制する効果があることがわかった。これは β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）が手、足、身体の清潔度を保つ新規素材として応用できる可能性を強く意味するもので、携帯用の消毒剤、高齢者で入浴不可能な人の身体の清拭、さらには病院内感染の防止や環境汚染物質の除去剤として非常に優れていることを示して示す。一方、病原微生物（大腸菌、ブドウ球菌、緑膿菌、サルモネラ菌）に対しても β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）はその増殖を抑制した。この結果は病原性微生物の消毒、さらには梅毒、淋病などの性病の予防など、 β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）を直接患部に塗布することで、病原微生物の増殖を抑制できることを意味している。緑膿菌、黄色ブドウ球菌は免疫力の低下した人の日和見感染症を起こす原因菌、またサルモネラ、大腸菌は食中毒の原因菌であることから、これらの感染症に β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）が大変有効であることが判明した。

【0119】(VII) β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）がポリオウイルスによるHela細胞の細胞変性効果(CPE)を抑制することが判明した。この所見は β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）がポリオウイルスのHela細胞表面上のポリオウイルスレセプター(CD31分子)への吸着を阻止した結果である。すなわち、 β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）が多くのDNAやRNAウイルスの細胞侵入や吸着（ウイルスによる感染）を予防できることを意味している。

【0120】(VIII) β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）に紫外線による細胞死を抑制する効果があることが判明した。ある一定の濃度で培養した β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）の細胞は紫外線を全く照射しなかった細胞群と同様に、細胞の形態が維持され、その増殖にもほとんど影響がなかった。一方、 β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）で培養されていない紫外線照射細胞群は細胞の著しい変性が認められ、最終的にはほとんどの細胞が死滅した。これらの結果は紫外線照射による細胞死（プログラム死）が β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）によって抑制されたことを意味する。 β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）が皮膚に悪影響を与え、皮膚癌を起こす紫外線の作用を防止する新規外用素材として応用可能であることが判明した。戸外で働

く労働者、スポーツ選手、また夏の海水浴シーズンの日焼け防止に有効であると共に β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）は肉体疲労やスポーツ後の痛み物質の除去にも応用可能である。

【0121】(IX) 1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）の作用機序に細胞内セコンドメッセンジャーの動態が重要であることが判明した。 β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）の作用機序をIL-8の産生能を指標に、各種リン酸化酵素に対するインヒビターを用いて解析した。その結果、 β -1.3-1.6グルカン（アウレオバシジウム培養液）の作用機序はprotein kinase C (PKC)、protein tyrosine kinase (PTK)などのリン酸化酵素や細胞内 Ca^{2+} の流入が密接に関わっていることがわかった。この所見は今まで全く報告されておらず、我々が初めて明らかにした事実である。

【0122】(X) アウレオバシジウム培養液に含まれる β -1.3-1.6グルカン以外の新規生理活性物質を同定した。アウレオバシジウム培養液には β -1.3-1.6グルカン以外の未知の生理活性物質が数多く含まれていると考えられる。その中から特に、免疫系の調節に関わる新規物質の同定を試みた。アウレオバシジウム培養液中には β -1.3-1.6グルカン以外にも免疫反応に重要な役割を果たすCD24とmNI-37分子が含まれていることがわかった。この所見は我々が世界で初めて明らかにした事実である。これらの分子がアウレオバシジウム培養液中に存在することは、主成分として含まれる β -1.3-1.6グルカンと相乗的に生体免疫反応を調節していることを意味している。このような形態を示す機能的な健康食品は今まで報告されておらず、我々の研究開発したアウレオバシジウム培養液は非常にユニークな物性や生理活性を持つことが判明した。

【図面の簡単な説明】

【図1】 β -1.3-1.6グルカンの末梢血リンパ球数に与える影響を示した図表。

【図2】 β -1.3-1.6グルカンの末梢血リンパ球の形態に与える影響を示した写真。

写真(a)：無添加

写真(b)：アウレオバシジウム培養液添加

【図3】 β -1.3-1.6グルカンの培養白血病細胞株の増殖に与える影響を示した図表。

【図4】 β -1.3-1.6グルカンの培養白血病細胞株の増殖に与える影響を示した図表。

【図5】 β -1.3-1.6グルカンの培養白血病細胞株の増殖に与える影響を示した図表。

【図6】 β -1.3-1.6グルカンの培養白血病細胞株の増殖に与える影響を示した図表。

【図7】 β -1.3-1.6グルカンの単球/マクロファージ系モデル細胞表面分子（レセプター分子）の動態に与える影響を示した解析図。

【図8】 β -1.3-1.6グルカンの環境微生物の増殖に与え

る影響を示した図面。

写真(a) : 無処理群

写真(b) : 処理群

【図9】 β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) によるウイルス感染防御効果を示した写真。

写真 (a) : β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) 処理+ポリオウイルス感染

写真 (b) : 無処理 (ポリオウイルス感染のみ)

【図10】 β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) の紫外線照射による細胞死の抑制効果を示した写真。

写真 (a) : 紫外線照射のみ

写真 (b) : β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) 処理+紫外線照射無処理

【図11】 β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) の細胞の形態に与える影響 (位相差顕微鏡所見 : $\times 100$) を示した写真。

写真 (a) : 無処理

写真 (b) : β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) (40倍希釈)

写真 (c) : β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) (20倍希釈)

写真 (d) : フォルボールエステル (PMA) (200ng/ml)

【図1】

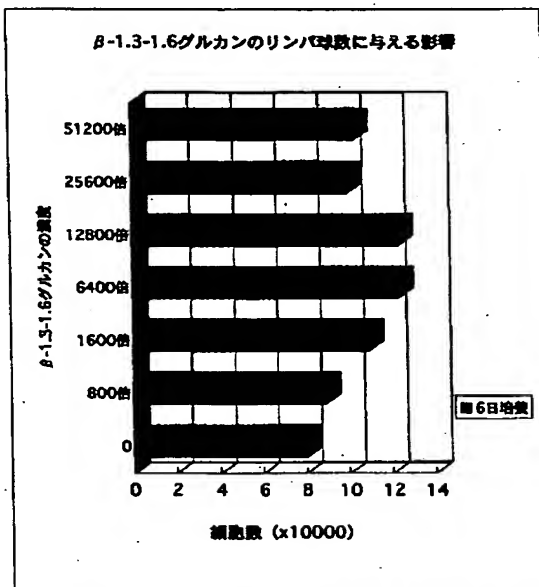


図1 β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) の細胞の形態に与える影響

【図12】 β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) の細胞の形態に与える影響 (電子顕微鏡所見 : $\times 8,000$) を示した写真。

写真 (a) : 無処理

写真 (b) : β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) (20倍希釈)

【図13】 β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) の培養細胞株(U937)細胞表面分子 (レセプター) に与える影響を示した図表。

a : 陰性対照、b : CD11a、c : CD11b、d : CD18、e : CD31、f : CD49d、g : CD54、h : C1qRp

無処理: (—)

β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) : (---)

【図14】 β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) の培養細胞株(HL-60)細胞表面分子 (レセプター) に与える影響を示した図表。

a : 陰性対照、b : CD11a、c : CD15、d : CD18、e : CD49d、f : CD54

無処理: (—)

β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) : (---)

【図3】

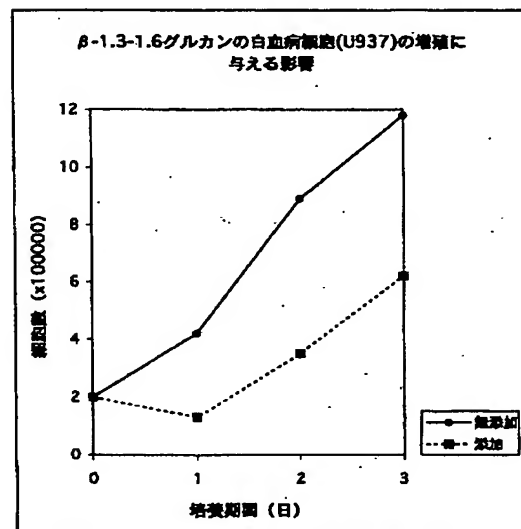
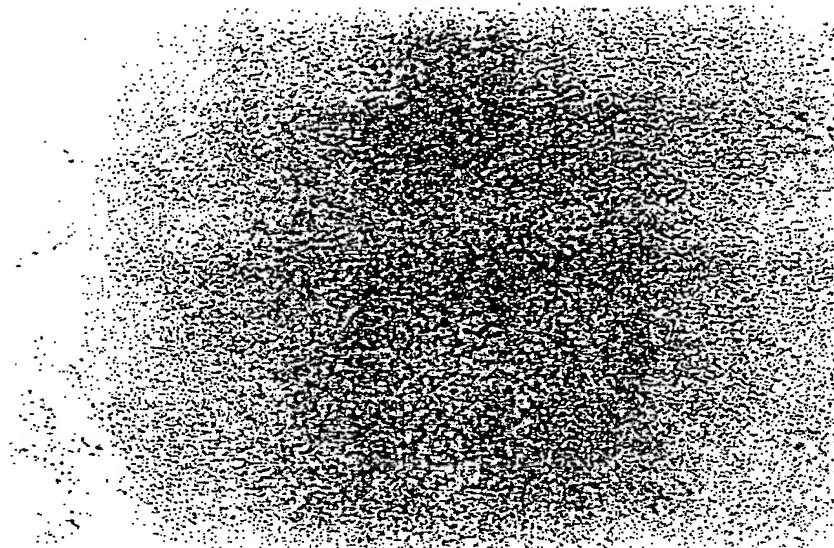
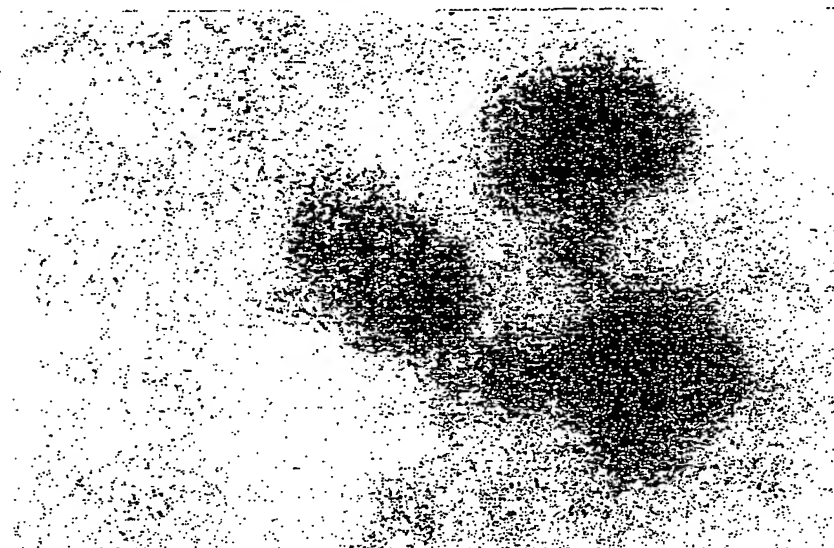


図3 β -1.3-1.6グルカン (アウレオバシジウム培養液) の細胞の増殖に与える影響

【図2】



(a) 無添加

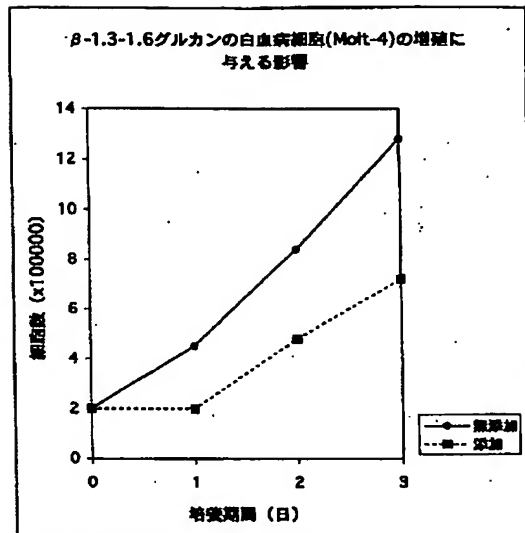


(b) β -1.3-1.6-グルカン (アウレオヘシジウム培養液) 添加

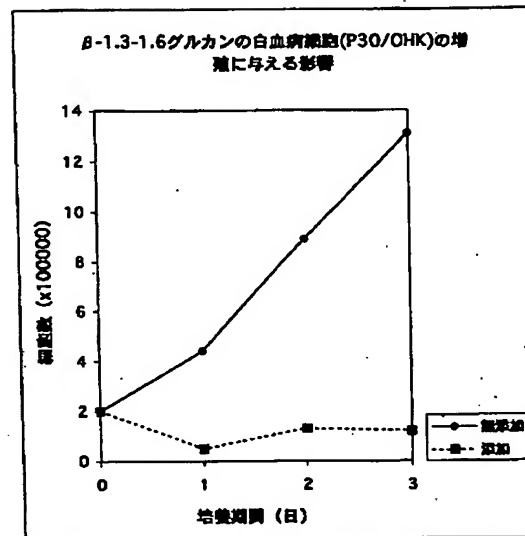
図2 : 写真

β -1.3-1.6-グルカン (アウレオヘシジウム培養液) の抹消血リンパ球の形態変化

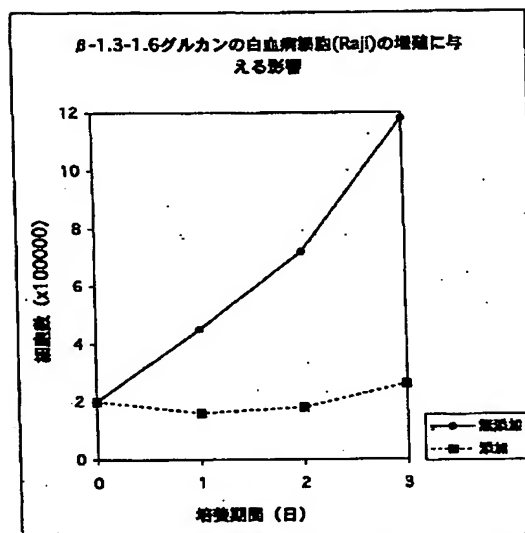
【図4】

図4 β -1.3-1.6グルカンの白血病細胞(Mo1e-4)の増殖に与える影響

【図5】

図5 β -1.3-1.6グルカンの白血病細胞(P30/OHK)の増殖に与える影響

【図6】

図6 β -1.3-1.6グルカンの白血病細胞(Raji)の増殖に与える影響

【図7】

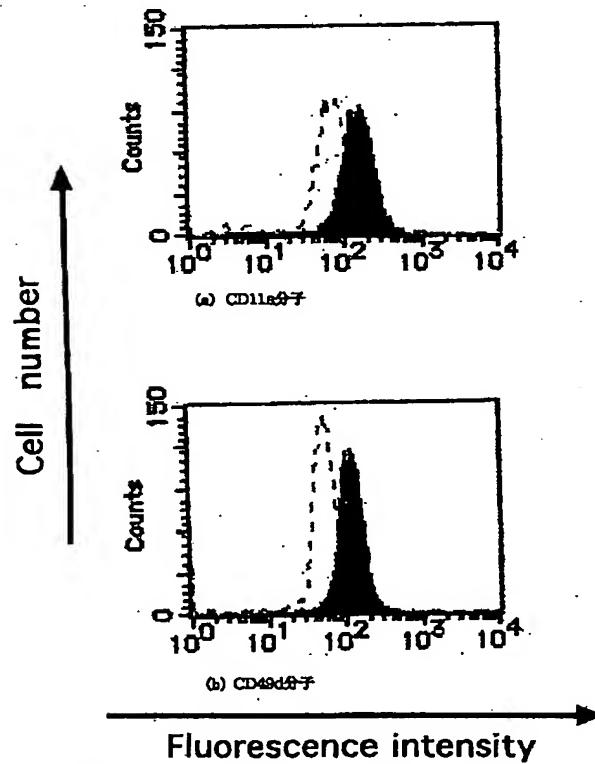
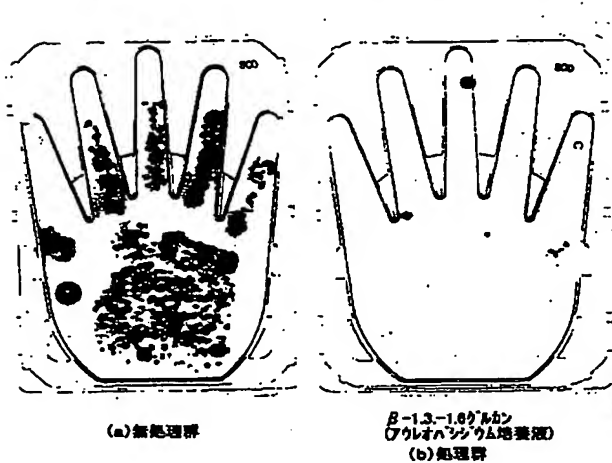


図7 β -1.3-1.6グルカン(アレーロパシウム培養液)の単球/マクロファージ系モデル細胞表面分子(レクター分子)の発現に与える影響

無添加: — / β -1.3-1.6グルカン(アレーロパシウム培養液)添加: ---

【図8】

図8 β -1.3-1.6 グルカン (アウレオバシジウム培養液) の環境微生物繁殖 (増殖) に与える影響



【図13】

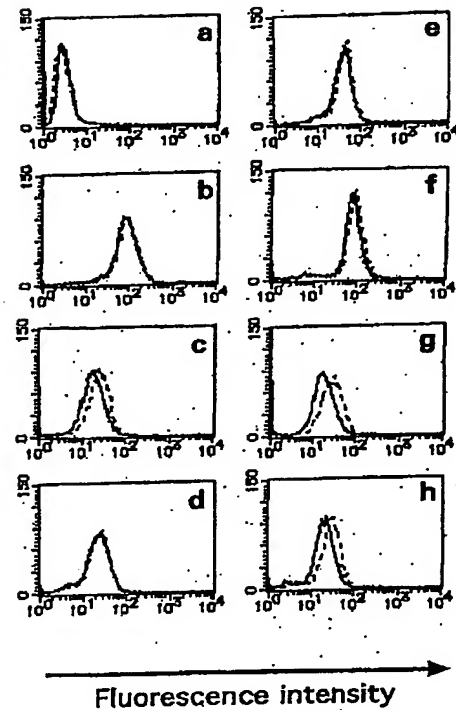


図13 β -1.3-1.6 グルカン (アウレオバシジウム培養液) の培養細胞株 (U937) 細胞表面分子 (レセプター) に与える影響

a: 陰性対照, b: CD11a, c: CD11b, d: CD18, e: CD31, f: CD49d, g: CD54, h: C1qR

無処理: (—)

β -1.3-1.6 グルカン (アウレオバシジウム培養液) 処理: (---)

【図14】

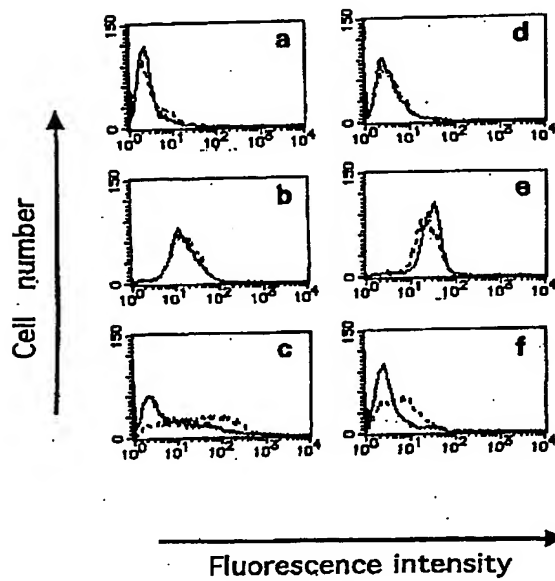


図14 β -1.3-1.6 グルカン (アウレオバシジウム培養液) の培養細胞株 (HL-60) 細胞表面分子 (レセプター) に与える影響

a: 陰性対照, b: CD11a, c: CD15, d: CD18, e: CD49d, f: CD54

無処理: (—)

β -1.3-1.6 グルカン (アウレオバシジウム培養液) 処理: (---)

【図9】

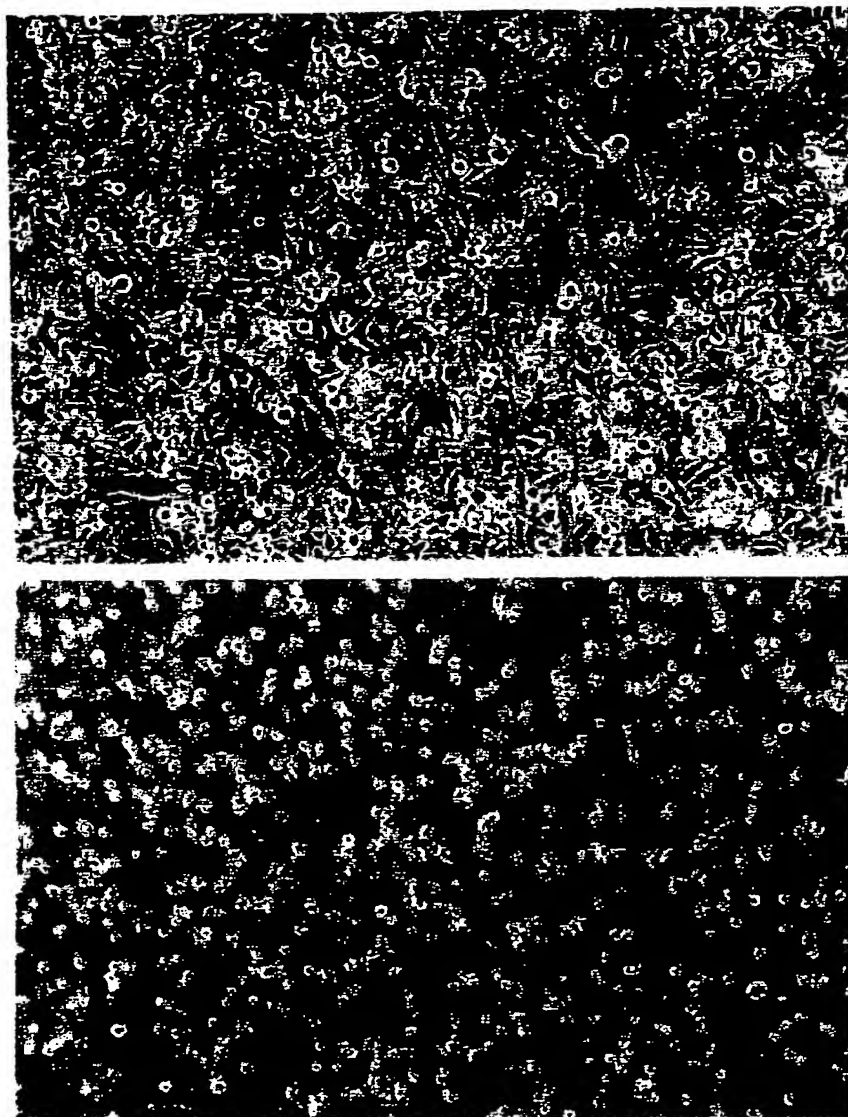


図9：写真 β -1.3-1.6-グルカン（アクトハジウム培養液）によるウイルス感染防
御効果

写真a： β -1.3-1.6-グルカン（アクトハジウム培養液）処理＋ポリオウイルス
感染

写真b：無処理（ポリオウイルス感染のみ）

BEST AVAILABLE COPY

【図10】

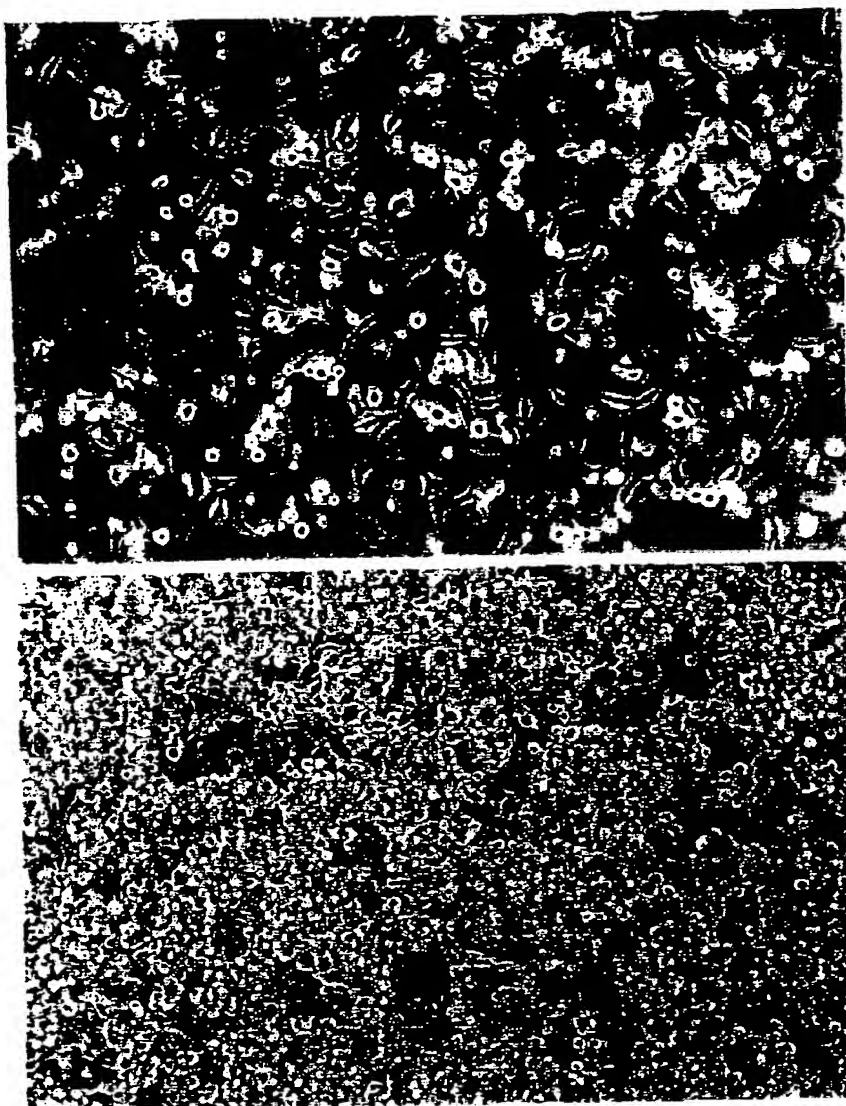


図10：写真 β -1.3-1.6-グルカン（アクレオバシジウム培養液）の紫外線照射による細胞死の抑制効果

写真a：紫外線照射のみ

写真b： β -1.3-1.6-グルカン（アクレオバシジウム培養液）処理＋紫外線照射無処理

BEST AVAILABLE COPY

【図11】

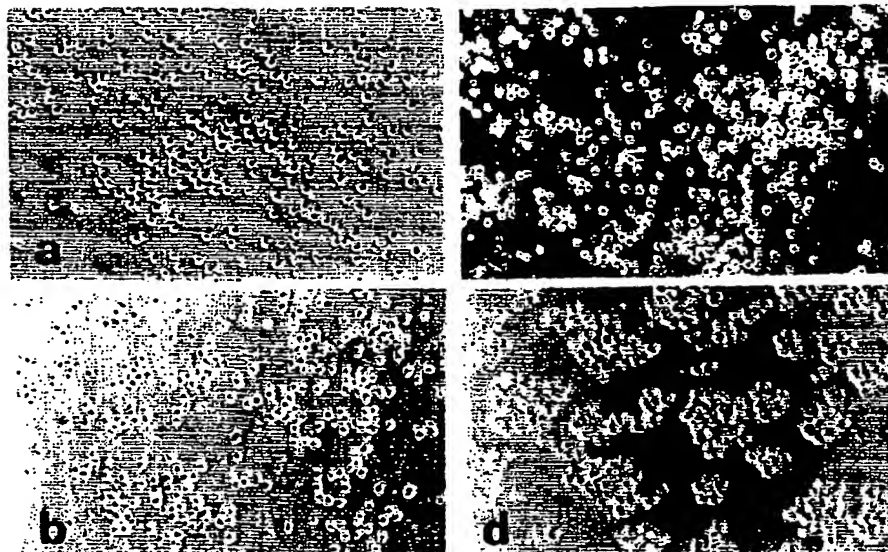


図11：写真 β -1.3-1.6-グルカン（アクトハシジウム培養液）の細胞の形態に与える影響（位相差顕微鏡所見 $\times 100$ ）

写真a：無処理

写真b： β -1.3-1.6-グルカン（アクトハシジウム培養液）（40倍希釈）

写真c： β -1.3-1.6-グルカン（アクトハシジウム培養液）（20倍希釈）

写真d：フォルボルエステル（PMA）（200 ng/ml）

【図12】

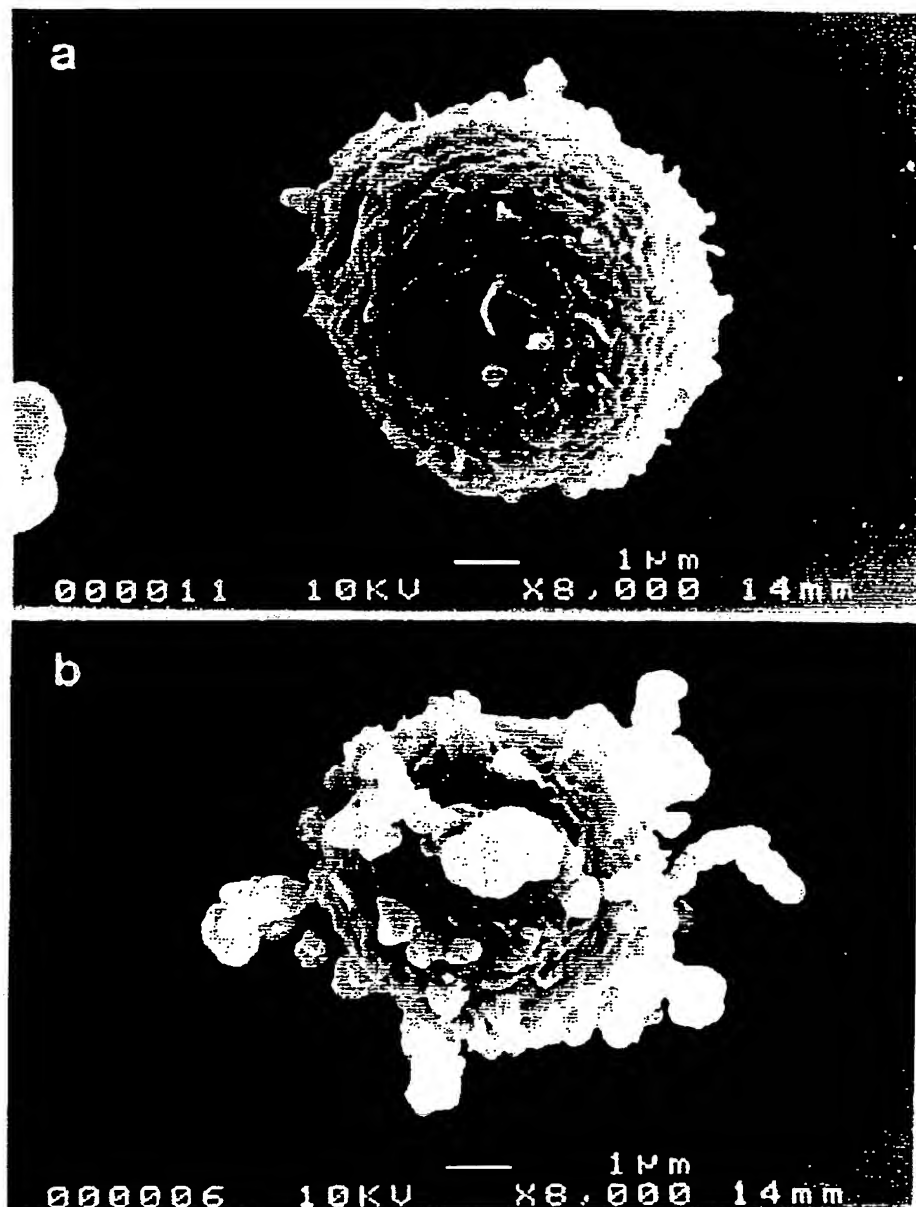


図12：写真 β -1.3-1.6-グルカン（アクトバシウム培養液）の細胞の形態に与える影響（電子顕微鏡所見： $\times 8,000$ ）

写真a：無処理

写真b： β -1.3-1.6-グルカン（アクトバシウム培養液）（20倍希釈）

BEST AVAILABLE COPY

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	ノート(参考)
A 6 1 K 35/72		A 6 1 K 35/72	4 C 0 8 7
A 6 1 P 1/16		A 6 1 P 1/16	
3/10		3/10	
9/10	1 0 1	9/10	1 0 1
9/12		9/12	
13/00		13/00	
19/02		19/02	
19/10		19/10	
25/00		25/00	
25/28		25/28	
29/00	1 0 1	29/00	1 0 1
31/04		31/04	
31/12		31/12	
35/00		35/00	
37/02		37/02	
G 0 1 N 33/50		G 0 1 N 33/50	T
/(C 1 2 N 1/16		(C 1 2 N 1/16	A
C 1 2 R 1:645)		C 1 2 R 1:645)	

Fターム(参考) 2G045 AA28 BB19 BB20 CB21 DA30
 FA16 FB03
 4B018 MD33 MD81 ME03 ME04 ME08
 ME09 ME14 MF01 MF04 MF13
 4B065 AA72X CA22 CA41 CA44
 CA46
 4C083 AA031 AA032 AD211 AD212
 CC19 CC22 CC24 EE12 EE17
 4C086 AA01 AA02 EA20 MA01 MA04
 NA14 ZA01 ZA15 ZA16 ZA42
 ZA45 ZA75 ZA81 ZA96 ZA97
 ZB07 ZB15 ZB26 ZB33 ZB35
 ZC35
 4C087 AA01 AA02 BC11 CA14 MA01
 NA14 ZA01 ZA15 ZA16 ZA42
 ZA45 ZA75 ZA81 ZA96 ZA97
 ZB07 ZB15 ZB26 ZB33 ZB35
 ZC35